

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**  
**ДНІПРОВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНО-ЕКОНОМІЧНИЙ**  
**УНІВЕРСИТЕТ**  
**ІНСТИТУТ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА ЗДОРОВ'Я ТВАРИН**  
**ФАКУЛЬТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ**  
Спеціальність 211 – «Ветеринарна медицина»

**ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ**

Зав. кафедри епізоотології  
та інфекційних хвороб тварин  
док. вет. наук, проф. \_\_\_\_\_ О.А. Ткаченко

«\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 р.

**ДИПЛОМНА РОБОТА**

**ОСОБЛИВОСТІ ВІРУЛЕНТНОСТІ ШВИДКОРОСЛИХ**  
***MYSOBACTERIUM BOVIS* ЗА ПАСАЖІВ В УМОВАХ НАВЧАЛЬНОЇ**  
**ЛАБОРАТОРІЇ КАФЕДРИ ЕПІЗООТОЛОГІЇ ТА ІНФЕКЦІЙНИХ**  
**ХВОРОБ ТВАРИН ДНІПРОВСЬКОГО ДЕРЖАВНОГО**  
**АГРАРНО-ЕКОНОМІЧНОГО УНІВЕРСИТЕТУ**

**26.03 – ДР. 873 20 05 08. 051. ПЗ**

Студентка-дипломниця \_\_\_\_\_ А.Р. Пономаренко

Керівник дипломної роботи  
док. вет. наук, проф. \_\_\_\_\_ О.А. Ткаченко

Консультанти:  
з охорони праці  
канд. с.-г. наук, доц. \_\_\_\_\_ В.О. Сапронова

з економічних питань  
канд. вет. наук., доц. \_\_\_\_\_ В.В. Зажарський

Дніпро – 2020

## З М І С Т

РЕФЕРАТ .....	4
АНОТАЦІЯ .....	6
ВСТУП .....	12
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....	15
1.1. Визначення захворювання, історична довідка та поширення..	15
1.2. Епізоотологічні особливості туберкульозу тварин .....	19
1.3. Інфекційний процес при туберкульозі у тварин .....	22
1.4. Діагностика туберкульозу .....	25
1.5. Заходи боротьби з туберкульозом .....	29
2. ВЛАСНІ ДОСЛІДЖЕННЯ .....	32
2.1. Матеріал і методи досліджень .....	32
2.2. Характеристика навчальної лабораторії .....	40
2.3. Результати власних досліджень та їх аналіз .....	42
2.4. Розрахунок економічної ефективності .....	50
3. ОХОРОНА ПРАЦІ У ВЕТЕРИНАРНІЙ МЕДИЦИНІ .....	52
3.1. Аналіз стану охорони праці в умовах навчальної лабораторії кафедри епізоотології та інфекційних хвороб тварин .....	52
3.2. Аналіз небезпечних та шкідливих виробничих факторів .....	53
3.3. Пожежна безпека .....	56
ВИСНОВКИ І ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ .....	58
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ .....	59
ДОДАТКИ .....	64

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

У даній дипломній роботі зустрічаються скорочення термінів та назв, які перераховано нижче:

**M. bovis** – *Mycobacterium bovis*;

**BCG** – вакцина проти туберкульозу;

**pH** – водневий показник;

**ІФА** – імуно-ферментний аналіз;

**ПЛР** – полімеразна ланцюгова реакція.

## РЕФЕРАТ

Дипломна робота викладена на 74 сторінках комп'юторної верстки, ілюстрована 7 рисунками, 2 таблицями та 5 додатками. Список використаної літератури налічує 50 джерел, з них 6 зарубіжних авторів.

**Тема роботи:** «Особливості вірулентності швидкорослих *Mycobacterium bovis* за пасажів в умовах навчальної лабораторії кафедри епізоотології та інфекційних хвороб тварин Дніпровського державного аграрно-економічного університету».

**Мета роботи:** з'ясування прояву інфекційного процесу у морських свинок за прямих пасажів високовірулентного швидкорослого штаму *Mycobacterium bovis*.

**Завдання роботи:**

Для досягнення мети визначили завдання до яких входило вивчення у швидкорослих *M. bovis*:

–культуральних властивостей;

–тинкторіальних властивостей;

–біологічної активності (вірулентності);

- за прямих пасажів *M. bovis* через організм морських свинок встановити динаміку змін вірулентності.

**Предмет дослідження:** вірулентність *M. bovis* за прямих пасажів.

**Об'єкт дослідження:** високовірулентний швидкорослий штам *M. bovis*.

**Методи дослідження:** бактеріологічний (мікроскопічні, культуральні), патолого-анатомічний, алергічний та статистичний (обчислення та статистична обробка результатів).

Основні результати дипломної роботи представлені у статті «Залежність біохімічної активності *Mycobacterium bovis* від пасажів і температури культивування», О. А. Ткаченко, Н. І. Козак, М. В. Білан, А. Р. Пономаренко. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*, 7(2). – 2019 р.– 84-89 с. (додаток А). Пономаренко А. Р. приймала участь в Міжнародній науково-практичній конференції «Інфекційна патологія тварин: сучасні методи

діагностики, лікування та профілактики» (м. Дніпро, 21-22 вересня 2018 р.) **(додаток Б)** та VIII Міжнародній науково-практичній конференції «Ветеринарні препарати: розробка, контроль якості та застосування» (м. Львів, 1-4 жовтня 2019 р.) **(додаток В)**.

## АНОТАЦІЯ

Дипломна робота Пономаренко А. Р. на тему: «Особливості вірулентності швидкорослих *Mycobacterium bovis* за пасажів в умовах навчальної лабораторії кафедри епізоотології та інфекційних хвороб тварин Дніпровського державного аграрно-економічного університету».

В дипломній роботі наведені результати вивчення змін культуральних і тинкторіальних властивостей та дослідження біологічної активності (вірулентності) швидкорослих *M. bovis* за прямих пасажів. Дослідження проводили на морських свинках масою тіла 250-300 г, не реагуючих на ППД-туберкулін для ссавців (відповідно до існуючих вимог).

В результаті досліджень встановлено, що досліджувані швидкорослі патогенні мікобактерії проявляють біологічну активність, яка характеризується певною закономірністю тривалості інфекційного процесу. В перші чотири прямих пасажів через організм морських свинок тривалість виживання послідовно знижується і на четвертому пасажі вона виявилася найкоротшою і склала 29-33 діб. В наступному, розпочинаючи з п'ятого пасажу, тривалість інфекційного процесу скорочувалася і вже на 8-10-му пасажі морські свинки залишалися живими.

У всіх досліджених свинок до сьомого пасажу на 17-21-у добу формувалися виразки в ділянці введення зависі (суспензії) мікобактерій. Виразки мали тенденцію до ускладнення впродовж досліду.

В той же час алергічними дослідженнями дослідних морських свинок усіх пасажів на 30-у добу досліду виявляли алергічну реакцію на ППД-туберкулін для ссавців, в тому числі і в тварин 8-10-го пасажів, у яких інтенсивність реакції проявлялася менш демонстративно в порівнянні з реакціями, які виявлялися у морських свинок перших пасажів.

Морські свинки, через організм яких пасажувалися *M. bovis* 100-ої субкультури, гинули від туберкульозу тільки в перші два пасажі, строк

загибелі за цього практично рівнявся такому сьомому пасажу 20-ої генерації першого досліду. В третьому – шостому пасажі морські свинки не гинули впродовж 90 діб досліду. На цьому тлі виразка утворювалася у морських свинок тільки до четвертого прямого пасажу, але алергічні реакції відмічалися у дослідних тварин до закінчення досліду, тобто включно до шостого пасажу.

Найвищий індекс ураження (від 22-х до 24-х) за прямого пасажування 10-ої субкультури спостерігався впродовж чотирьох прямих пасажів. Надалі цей показник поступово знижувався і вже на восьмому пасажі він склав 5,4, що в 4,29 рази нижче, ніж в перші чотири пасажі. Водночас звертає увагу той факт, що хоча дослідні морські свинки 8-10-го пасажу лишалися живими до 90-ої доби спостереження, патолого-анатомічні зміни все ж таки виявлялися.

Практично в такій же послідовності індекс ураження спостерігався і за пасажів субкультури 100-го пересіву. Проте максимальний індекс ураження виявлено при першому прямому пасажі. Розпочинаючи з другого наступного пасажу, частота патолого-анатомічних змін, уражень тенденційно знижувалася і вони виявлялися практично тільки в лімфатичних вузлах, легенях та селезінці.

Результати контролю із замороженим біологічним матеріалом та пасажованими субкультурами на 10-му та шостому прямому пасажі виявилися подібними першому та другому досліду. Так при зараженні морських свинок суспензією, приготовленою із біологічного матеріалу дослідних тварин з туберкульозними змінами, виявлено алергію на туберкулін, виразку у ділянці введення суспензії та патолого-анатомічні зміни з індексом ураження 24. Зараження морських свинок пасажованими десять разів *M. bovis* через щільне живильне середовище Левенштейна-Йєнсена супроводжувалося такою ж біологічною відповіддю, що й у першому пасажі з індексом ураження 24 внутрішніх органів дослідних тварин.

У другому досліді, з використанням як замороженого біологічного матеріалу, так і пасажованих 100 разів *M. bovis* через щільне живильне

середовище Левенштейна-Йєнсена встановлені подібні результати, проте індекс ураження внутрішніх органів тварин так само, як і у дослідних тварин виявився дещо нижчим в 0,85 та 0,8 рази.

Паралельно зниженню індексу ураження внутрішніх органів морських свинок спостерігалось й динамічне згасання в порівнянні з алергічними реакціями, які проявлялися у морських свинок першого пасажу, інтенсивності прояву алергічних реакцій на ППД-туберкулін для ссавців.

В той же час у морських свинок першого пасажу, заражених мікобактеріями вихідної 10-ої субкультури, і заражених суспензією біологічного матеріалу (який знаходився в замороженому стані 20 місяців), інтенсивність алергічної реакції, патолого-анатомічний прояв і утворення виразки в ділянці інюкуляції суспензії характеризувалися однаковими показниками.

Подібне виявлено і в контролі з використанням у десятому пасажі зависі мікобактерій, приготовлених з субкультур, одержаних на середовищі Левенштейна-Йєнсена: за цього інтенсивність алергічної реакції, індекс ураження, утворення виразки у морських свинок були ідентичними.

Дані другого експерименту з використанням замороженого та розмороженого біологічного матеріалу через 20 місяців, а також пасажованих через штучне живильне середовище субкультур 100-ої генерації мікобактерій та заражених ними морських свинок на шостому пасажі засвідчили подібні першому досліді результати. Це переконливо свідчить про загальні біологічні властивості мікобактерій – знижувати ступінь вірулентності за прямих пасажів через організм морських свинок.

**Ключові слова:** завись, суспензія, мікобактерії, вірулентність, патогенність, інфекційний процес.



## ANNOTATION

Diploma paper of Ponomarenko A.R. on the theme: «Peculiarities of virulence of fast-growing *Mycobacterium bovis* at passages in the conditions of educational laboratory of the Department of Epizootology and Infectious Diseases of Animals of the Dnipro State Agrarian and Economic University».

The diploma paper presents the results of investigation of changes in cultural and tinctorial properties and the investigation of biological activity (virulence) of fast-growing *M. bovis* in direct passages. The investigation was performed on guinea pigs with body weight 250-300 g, not responding to PPD-tuberculin for mammals (according to existing requirements).

As a result of research it is established, that the investigated fast-growing pathogenic mycobacteria show biological activity, which was characterized by a certain pattern of duration of the infectious process. In the first four direct passages through the organism of guinea pigs, the duration of survival was consistently reduced and in the fourth passage, it was the shortest and amounted to 29-33 days. In the following, starting from the fifth passage, the duration of the infectious process was reduced and already on the 8th-10th passage the guinea pigs remained alive.

In all investigated pigs to the seventh passage on the 17-21 days the ulcers were formed in the site of introduction of the suspended matter (suspension) of mycobacteria. The ulcers tended to complicate throughout the experiment.

At the same time, by means of allergic investigations of guinea pigs of all passages on the 30th day of the experiment had been revealed an allergic reaction to PPD-tuberculin for mammals, including animals of 8-10th passages, in which the intensity of the reaction was less demonstrative compared to the reactions which were found in guinea pigs of the first passages.

Guinea pigs, through organism of which *M. bovis* of the 100th subculture was passaged, died from the tuberculosis only in the first two passages. The death

period for this guinea pigs was almost equal to the seventh passage of the 20th generation of the first experiment. In the third - sixth passage, the guinea pigs did not die during 90 days of the experiment. Against this background, the ulcers were formed in guinea pigs only up to the fourth direct passage, and allergic reactions were observed in experimental animals before the end of the experiment, that is up to and including the sixth passage.

The highest lesion index (from 22 to 24) in direct passage of the 10th subculture was observed during four direct passages. In the future, this index gradually decreased and already on the eighth passage it was 5,4, which was 4,29 times lower than in the first four passages. At the same time, it is noteworthy that although the experimental guinea pigs of the 8th-10th passage remained alive until the 90th day of observation, pathological and anatomical changes were still detected.

In almost the same sequence, the lesion index was observed for passages of the subculture of the 100th inoculation. However, the maximum lesion index was detected in the first direct passage. Starting from the second following passage, the frequency of pathological and anatomical changes, lesions tended to decrease and they were found almost only in the lymph nodes, lungs and spleen.

The results of the control with frozen biological material and passaged subcultures on the 10th and sixth direct passages were similar to the first and second experiments. Thus, when guinea pigs were infected with the suspension prepared from biological material of experimental animals with tuberculous changes, tuberculin allergy, ulcer at the site of inoculation of suspension and pathological and anatomical changes with lesion index 24 were detected.

The infection of guinea pigs with *M. bovis* passaged ten times through Löwenstein-Jensen dense nutrient medium was accompanied by the same biological response as in the first passage with an index of lesion 24 of internal organs of experimental animals.

In the second experiment, using both frozen biological material and 100 times passaged *M. bovis* through the dense nutrient medium Löwenstein-Jensen had

been found similar results, but the index of lesion of the internal organs of animals as well as experimental animals was slightly lower in 0,85 and 0,8 times.

In parallel with the decrease of the lesion index of the internal organs of guinea pigs, there was the dynamic attenuation in comparison with the allergic reactions, which were manifested in guinea pigs of the first passage, and the intensity of allergic reactions to PPD-tuberculin for mammals.

At the same time, at guinea pigs of the first passage, infected with mycobacteria of the initial 10th subculture, and infected with the suspension of biological material (which was in the frozen state in the course of 20 months) the intensity of allergic reactions, pathological and anatomical manifestations and ulceration in the site of inoculation of the suspension characterized by the same indices.

The same was found in the control with the utilization in the tenth passage of the suspension of mycobacteria prepared from subcultures obtained on Löwenstein-Jensen medium: the intensity of the allergic reaction, the lesion index, the formation of ulcers in guinea pigs were identical.

The data of the second experiment with utilization of frozen and defrosted biological material after 20 months, as well as subcultures of the 100th generation of mycobacteria and infected guinea pigs passaged through artificial nutrient medium at the sixth passage showed results similar to the first experiment. This convincingly demonstrates the general biological properties of mycobacteria – to reduce the degree of virulence in direct passages through the organism of guinea pigs.

**Key words:** suspended matter, suspension, mycobacteria, virulence, pathogenicity, infectious process.

## ВСТУП

Туберкульоз тварин – надзвичайно актуальна проблема ветеринарної медицини вже багато десятиліть. Хвороба досить поширена і завдає суттєвих економічних збитків тваринницьким господарствам, а інколи реально загрожує здоров'ю людини. Відсутність специфічного протитуберкульозного препарату стримує викорінення цієї хвороби [2, 7, 5].

Глобальна проблема туберкульозу тварин та людини існує з давнини. Причини цьому найрізноманітніші: абіотичного й біотичного характеру. Основні це, звичайно, причини пов'язані з біологією збудника хвороби. Усім мікобактеріям, у тому числі *M. bovis*, властива генетично закладена здатність змінюватись як фенотипово, так і генотипово – втрачаючи (знижуючи активність) деякі гени з одночасною появою (активізацією) інших. Зміни можуть відбуватись як під дією факторів довкілля, так і незалежно від них, що підтверджує лабільність закладеного в мікробній клітині геному з генами дрімаючими, активними та такими, що активують оживлення. Саме вони визначають ту чи іншу здатність мікобактерій на певній стадії розвитку зберігання високої ймовірності реверсії у вихідну форму чи конверсії в наступну форму з чітко вираженими, постійними, генетично закріпленими або з тимчасовими (фенотиповими), ледь помітними властивостями: змінюється морфологія мікобактерій, культуральні, біохімічні та інші властивості, ліпідний склад. Це визначає неймовірно високу адаптивну здатність мікроорганізму виживати в довкіллі, пересувати в макроорганізмі, не викликаючи відповідних реакцій, а тому й не діагностуються. Проте за певних умов окремі морфологічні форми мікобактерій у тому або іншому стані біологічного циклу розвитку реверсують в агресивну (кислотостійку класичну паличку), викликають інфекційний процес тієї чи іншої складності з відповідною реакцією макроорганізму. Тільки ці реакції вже діагностуються. Якщо ці питання дещо з'ясовані окремими авторами, то інші, пов'язані зі стійкістю в довкіллі

потребують деталізації, особливо що стосується дисоціативних варіантів *M. bovis* [3, 5, 6, 8].

У великої рогатої худоби туберкульоз має важливе соціальне значення, тому що збудник може передаватися людині, що призводить до захворювання, і, навпаки, тварини можуть заразитися від людей. Недостатність знань щодо латентної інфекції, відсутність високоспецифічних методів ранньої діагностики і профілактики туберкульозу не дає можливість ефективно проводити епізоотологічний моніторинг щодо туберкульозу. Це, безперечно, потребує цілеспрямованого вивчення проблеми туберкульозу, особливо в умовах конкретної природно-географічної зони, біотичні та абіотичні фактори якої можуть суттєво впливати не тільки на видовий склад мікобактерій, а також і атипових, але й на вірулентні властивості збудника [2, 9, 11].

З розвитком технологій досліджень, сучасних методологічних підходів з'являються все нові й нові повідомлення щодо біологічних властивостей збудника туберкульозу. Це в значній мірі обґрунтовує низьку ефективність заходів профілактики та викорінення хвороби тварин. Особливо значна кількість повідомлень авторів-дослідників цієї проблеми стосується мінливості мікобактерій, яка проявляється під впливом захисних сил макроорганізму, чинників довкілля, та ряду хімічних речовин. Звичайно, ця адаптивна мінливість збудника туберкульозу спрямована на виживання мікроорганізму в природі. Проте змінюючись за рядом характеристик біологічних властивостей, в тому числі й антигенних, через недосконалість методів ідентифікації мікобактерій з такими змінами вони тривало персистують в тканинах мікроорганізму.

Таким чином відмічається, що в окремих неблагополучних по туберкульозу сільськогосподарських підприємствах в часі алергічних досліджень сприйнятливого поголів'я (великої рогатої худоби) спостерігається зміщення частоти прояву специфічних туберкулінових реакцій в сторону параалергічних. Це зумовлено більш частою адаптацією до

тканин мікроорганізму атипових мікобактерій різних груп за класифікацією Раніона та зменшенням впливу *M. bovis*, пояснюючи це трансформацією типових форм збудника. В 2004 році виділено з біологічного матеріалу реагуючої на туберкулін корови (без патолого-анатомічних змін туберкульозу) *M. bovis*, які утворювали колонії на живильному середовищі на 2-3 добу культивування та вбивали свинок до 35-45 діб. З цього приводу існує думка про те, що в умовах активних заходів боротьби з туберкульозом в процесі трансформації відбуваються не лише зміни клітинної стінки, але й глибокі структурні зміни збудника, що торкаються його біологічних властивостей. Між тим, вивчаючи вірулентність мікобактерій виділених з туберкульозними змінами органів людини автор Ю. К. Вейсфейлер, встановив, що у морських свинок третього прямого пасажу туберкульозних змін в органах вже не спостерігалось. Це питання важливе для швидкорослих *M. bovis* оскільки можна було б допустити, що швидке розмноження мікобактерій та їх накопичення в макроорганізмі може пришвидшувати розвиток інфекційного процесу (хворобу) особливо за прямих пасажів через організм морських свинок. Тому обґрунтованим виявилось проведення експерименту по з'ясуванню залежності ступеня вірулентності *M. bovis* від прямих пасажів через організм морських свинок [5, 8, 16].

**Об'єкт дослідження:** інфекційний процес за туберкульозу.

**Предмет дослідження:** вірулентність *M. bovis* за прямих пасажів.

**Мета роботи:** з'ясування прояву інфекційного процесу у морських свинок за прямих пасажів високовірулентного швидкорослого штаму *Mycobacterium bovis*.

Для досягнення мети визначили **завдання** до яких входило вивчення у швидкорослих *M. bovis*: культуральних властивостей; тинкторіальних властивостей; біологічної активності (вірулентності); за прямих пасажів *M. bovis* через організм морських свинок встановити динаміку змін вірулентності.

**Методи дослідження:** бактеріологічний (мікроскопічні, культуральні), патолого-анатомічний, алергічний та статистичний (обчислення та статистична обробка результатів).

## 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Визначення захворювання, історична довідка та поширення

До наших часів туберкульоз прийшов з глибини віків. Ще в середині XVI ст. італійський вчений епохи Відродження – лікар, астроном і поет Джироламо Фракастро (1478-1553 рр.) – у своїй праці “Про контагії, контагіозні хвороби і лікування” (1546 р.) висловив думку, що сухоти, як і інші заразні хвороби, викликають невидимі зародки (*seminaria*), які поширюються шляхом контакту.

Туберкульоз (*Tuberculosis*) – хронічна хвороба домашніх і диких тварин та птиці, що характеризується утворенням у різних органах дрібних специфічних безсудинних вузликів (туберкул), схильних до сирнистого розпаду та звапніння. На туберкульоз хворіє людина [3, 2, 7].

Цілеспрямоване багаторічне вивчення хвороби вченими та практиками країн світу сприяло пізнанню та виявленню особливостей епізоотології, інфекційного процесу, розробці на цій основі заходів профілактики, боротьби з нею. Лише їх реалізація привела до викорінення інфекції тварин на окремих природно-географічних територіях, а на інших ця хвороба тварин реєструється на мінімальному рівні. Проте в більшості країн світу туберкульоз тварин значно поширений. Відсутність специфічного протитуберкульозного препарату стримує викорінення цієї хвороби [2, 8, 10].

В історичних рукописах Вавилону, Китаю та Індії є записи, що свідчать про наявність цієї хвороби в ті далекі часи, усвідомлення її заразливості й можливості передавання від людини до людини. У Стародавній Греції туберкульоз був описаний Гіппократом, Галеном, Демокритом, було наведено клінічну картину хвороби та рекомендації з її лікування. Термін «туберкульоз» вперше використав французький лікар Леннек (1819). Інфекційну природу туберкульозу встановлено в 1865 р. Віллеменом, який відтворив експериментальне зараження кролів підшкірним введенням

частинок уражених туберкульозом легень від померлої людини. У 1868 р. Шово першим заразив телят шляхом згодовування патологічного матеріалу від хворої на туберкульоз корови. Клебс вперше визначив небезпечність молока хворих корів для дітей, а Шово – м'яса від туберкульозних тварин для людини.

Німецький вчений Роберт Кох у 1880-1882 рр. виділив культуру мікобактерій із органів і мокроти хворих людей, із різних органів спонтанно інфікованих та від експериментально заражених тварин. Це відкриття Р. Коха стало початком нової ери у вивченні туберкульозу [39, 40, 44].

Згідно сучасної класифікації, збудники туберкульозу належать до порядку *Actinomycetales* родини *Mycobacteriaceae*, роду *Mycobacterium* (*mycos* – гриб, *bacterium* паличка). Останній включає велику групу кислотостійких мікробів, які є спорідненими з нижчими рослинними мікроорганізмами – актиноміцетами. На генетичний зв'язок мікобактерій з актиноміцетами вказує спільність способів розвитку, живлення та спорідненість структури. Кальметт і Герен у 1924 р. виготовили вакцину BCG для профілактики туберкульозу у людей [17, 19, 26, 46].

Мікроорганізми роду *Mycobacterium* широко розповсюджені в природі у вигляді сапрофітів, патогенних і умовно-патогенних мікобактерій. Патогенними вважаються: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*, *M. africanum*, *M. leprae*, *M. paratuberculosis*; умовно-патогенними: *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. xenopi* та ін. Результати таксономічного вивчення штамів мікобактерій туберкульозу, виділених в різних країнах свідчать про гетерогенність кожного виду роду *Mycobacterium* і близьку спорідненість *M. tuberculosis* і *M. bovis* [19, 38, 39].

Мікроби, які належать до роду *Mycobacterium* – кислото- і спиртостійкі, добре фарбуються за методом Ціль-Нільсена. Мікобактерії є факультативними аеробами і фарбуються за методом Грама позитивно. Але вони мають різні форми існування: фільтруючі, коковидні, L-форми, паличковидні, нитковидні та інші. Збереженість мікобактерій в



макроорганізмі обумовлена утворенням різних форм. Вони розмножуються, переважно, вегетативно – шляхом простого поперечного поділу (амітозу). При цьому цитоплазматична мембрана вигинається з обох боків клітини в середину цитоплазми, утворюючи перетинку, яка ділить материнську клітину на дві дочірні. Також можливе розмноження мікобактерій брунькуванням, утворенням шаровидних форм і розпадом їх на кислотостійкі зерна (гранули). При брунькуванні материнської клітини утворюється випинання, яке відділяється від неї. Гранули можуть перетворюватися в нові мікробні клітини, але в стадії зерен тимчасово втрачають кислотостійкість. Потім не кислотостійкі зерна через ряд послідовних стадій переходять в кислотостійкі мікобактерії [22, 25, 30].

У своїх працях науковці довели, що в процесі пасажування мікобактерій людського, бичачого і пташиного видів на невластивих для них тваринах посилюється патогенність для даного виду і на четвертому пасажі вони викликають інтенсивний розвиток туберкульозних уражень. Ці дані підтверджують думку, що *M. tuberculosis*, *M. bovis* і *M. avium* є похідними збудника, а їх різна вірулентність до одного і того ж виду тварин виникла в результаті довготривалого еволюційного процесу [26, 28, 39].

У зовнішньому середовищі мікобактерії туберкульозу як в чистій культурі, так і в патологічному матеріалі та секретах надзвичайно стійкі і довго зберігають свою вірулентність. Відмічено, що туберкульозні палички залишались життєздатними в річковій воді, ґрунті, гною 7 місяців, в молочних продуктах (маслі, сирі), які зберігалися на холоді – до 10 місяців. Також є повідомлення, що на склі в темряві мікобактерії туберкульозу виживають від 60 до 330 днів, при сонячному опроміненні – від 6 до 40 днів, у висушеній мокроті – до 8 місяців, а в річковій і стоячій воді – до 197 днів. Встановлено, що *M. bovis* у приміщеннях молочно-товарних ферм при незадовільному проведенні санітарно-ветеринарних заходів залишається життєздатним не менше ніж рік. При нагріванні чистої культури мікобактерій у воді до 57 °С загибель їх настає через 60 хвили [8, 41, 44, 50].

Деякі автори довели, що мікобактерії туберкульозу не гинуть в молоці, нагрітому до 70 °С, протягом 60 хвилин і до 90 °С – протягом 1 хвилини, але при пастеризації молока методом з температурою пару 90 °С мікобактерії бичачого виду гинуть за 30 секунд, а при звичайному нагріванні до 90 °С тільки за 5 хвилин. Мікобактерії туберкульозу здатні протистояти впливу високих концентрацій спирту, кислот, лугів і деяких інших хімічних речовин [12, 22, 49].

Аналізуючи дані Хазипова Н. З. й інших авторів, відмічено, що в природі широко розповсюджені мікобактерії різні за класифікацією Раніона. Із 80 зразків ґрунту, відібраних в приватних і колективних стадах, в 36 виявлені мікроорганізми нехроматогенної групи. В іншому випадку із досліджених проб ґрунту і зеленого корму виділили атипові мікобактерії: фотохромогенні – в 63 %, нехромогенні – в 18, 9 %, швидкоростучі – в 17,2 % і патогенні – в 0,9 %. В той же час, повідомляв далі автор, атипові мікобактерії виділили від кліщів, диких птахів. На підставі останнього зроблено висновок про наявність природних вогнищ як туберкульозу, так і мікобактеріозів [40].

В Україні боротьбі з туберкульозом тварин приділяють винятково велику увагу, завдяки чому за останні роки поширення хвороби припинилось. За даними ряду авторів масовому поширенню туберкульозу на фермах сприяють чинники, що знижують резистентність організму тварин. До них відносяться: неповноцінна годівля, посилена продукція молока без компенсації необхідних життєво важливих для організму мікроелементів, вітамінів, амінокислот, відсутність регулярного моціону на свіжому повітрі, тіснота і вогкість у приміщеннях, антисанітарні умови утримання тварин [12, 24, 39].

Отже, аналіз літературних джерел свідчить про те, що мікобактерії туберкульозу мають різноманітні форми та високу резистентність до впливу фізичних і хімічних факторів. Таким чином, виникненню та поширенню туберкульозу сприяють різноманітні фактори, які необхідно враховувати при

вивченні епізоотичної ситуації та підготовці плану заходів, направлених на ліквідацію цього захворювання.

## **1.2. Епізоотологічні особливості туберкульозу тварин**

До туберкульозу сприйнятливі багато видів домашніх і диких тварин, у тому числі хутрові звірі та птиці (більше 55 видів ссавців тварин і близько 50 видів птахів). Найбільш чутливі до туберкульозу велика рогата худоба, свині, з птахів – кури. Рідше хворіють собаки, кішки, качки, гуси, як виняток – коні, вівці, осли. Джерело збудника інфекції – хворі тварини, які виділяють мікобактерії з фекаліями, мокротою, молоком, а при ураженні сечостатевої шляхів – зі спермою. Збудник туберкульозу тривалий час може зберігатися в організмі у вигляді L-форм. Такі тварини часто залишаються невиявленими джерелами збудника туберкульозу. У несприятливих умовах L-форми мікобактерії можуть реверсувати у вихідний вигляд (у класичну форму мікобактерії) і стають причиною виникнення туберкульозу [8, 28, 35].

Масовому поширенню туберкульозу на фермах сприяють чинники, що знижують резистентність організму тварин. До них відносяться: неповноцінна годівля, посилена продукція молока без компенсації необхідних життєво важливих для організму мікроелементів, вітамінів, амінокислот, відсутність регулярного моціону на свіжому повітрі, тіснота і вогкість у приміщеннях, антисанітарні умови утримання тварин. Абсолютної несприйнятливості до туберкульозу немає в жодного виду тварин, а також і у людини. Розглядаючи перші етапи вивчення епізоотологічних особливостей туберкульозу великої рогатої худоби багато хто з дослідників стверджували, що порода, вік та спадковість впливають на сприйнятливість тварин до збудника інфекції. В теперішній час в науці і практиці є достатньо даних для ствердження, що порода не має вирішального значення щодо стійкості тварин до збудника туберкульозу. Але, при обстеженні стад великої рогатої худоби, неблагополучних щодо туберкульозу, зустрічаються випадки, які

свідчать про стійкість до збудника інфекції окремих тварин однієї і тієї ж породи конкретного стада [39, 41].

Вивчаючи показники алергічних досліджень, співвідношення інфікованості аналізованих груп тварин та інше, можна стверджувати, що серед тварин віком до 2,5 років інфікованість *M. bovis* в 1,6-2,5 рази менша, ніж в старшій віковій групі.

На початку ХХ століття в скандинавських країнах за спонтанного перебігу епізоотичного і інфекційного процесів чітко проглядається залежність прояву туберкульозного процесу від віку тварин.

За даними Юсковця М. К. в неблагополучних щодо туберкульозу великої рогатої худоби стадах серед телят 20-31-денного віку інфікованість *M. bovis* складає 3,5 %, 30-60 днів – 2,0 %; 60-100 днів – 2,1 %. В епізоотологічному експерименті дослідник спростовує твердження О. Вегмана про рідкісність прояву туберкульозного процесу у телят до трьохмісячного віку [44].

Останні 15 років в Україні епізоотична ситуація досить контрольована. В минуле відійшли гострі інфекції. У зонах Лісостепу і Полісся виникають спалахи хвороб, збудники яких розмножуються в організмі різних видів тварин де довго зберігаються, інколи розмножуються й поза організмом тварин. Особливих турбот тваринництву завдають так звані факторні хвороби, які мають комплексну етіологію – умовно патогенні мікроорганізми і абіотичні та біотичні фактори (умови утримання тощо) [7, 12].

В основу ефективної системи профілактичних та оздоровчих заходів слід покласти: постійний моніторинг епізоотичної ситуації у кожному господарстві, регіоні; рання і достовірна діагностика хвороб; своєчасне проведення необхідних ветеринарно-санітарних та організаційно-господарських заходів з профілактики та ліквідації інфекційних захворювань. При плануванні та проведенні протиепізоотичних заходів фахівці ветеринарної медицини і власники тварин особливу увагу повинні приділяти контрольованості епізоотичних процесів, здійснюючи моніторинг

етіологічних чинників хвороб та профілактичні заходи.

Серед інфекційних хвороб сільськогосподарських тварин та птиці найбільше епізоотологічне значення мають туберкульоз, хламідіоз, сказ, лейкоз, шлунково-кишкові та інші хвороби. В останні роки вчені розширили наше уявлення про джерела *M. bovis* в дикій фауні. Крім диких парнокопитних природними носіями мікобактерій бичачого виду є борсуки та опосуми, а також короткохвості мавпи і макаки Резус, ондатра може бути природнім резервуаром *M. bovis*. Крім того, збудник туберкульозу бичачого виду виділений від хруща, дощових черв'яків та іксодових кліщів [42].

Виділяється збудник туберкульозу із організму хворої тварини в зовнішнє середовище різними шляхами, що залежить від локалізації і характеру патологічного процесу: через органи дихання (особливо при кашлі), з молоком, фекаліями, слиною витками з піхви, з спермою. Донченко А. С. виділяв збудника туберкульозу у молоці 13,0 % реагуючих і у 0,8 % не реагуючих на туберкулін корів умовно-здорового стада [12, 39, 40].

Також велику небезпеку в розповсюдженні збудника туберкульозу серед телят мають фекалії. Встановлено, що хвора на туберкульоз корова при патологічному процесі в легенях або кишечнику виділяє з калом за добу до 37 млн. туберкульозних бактерій. Це сприяє високому обсіменінню збудником туберкульозу тваринницьких приміщень (стін, підлоги, напувалок, годівниць, транспортерів, доїльних установок), повітря предметів догляду, кормів, одягу обслуговуючого персоналу, транспорту тощо. В неблагополучних господарствах забруднюється ґрунт, водоймища, рослинність тощо. Так, Г. І. Хільченко й інші автори виділяли мікобактерії в 21,6 % досліджених проб навколишнього середовища тваринницьких об'єктів, з них в 26,3 % – атипові та 73,7 % – бичачого виду [41].

Зараження молодняка великої рогатої худоби збудником туберкульозу в усі періоди життя відбувається, як правило, аліментарно через молоко, особливо в молочний період, а також аерогенно. В останньому випадку збудник інфекції попадає в дихальні шляхи з повітрям і пилинками, які

містять мікобактерії. При аліментарному шляху інфікування збудник туберкульозу може попадати в організм з кормом. Особливо небезпечним є випоювання телятам непастеризованих збірного молока та відвійок. Неякісна пастеризація збірних відвійок, які надходять в благополучні господарства, може призвести до швидкого і широкого поширення інфекції.

Епізоотологічні особливості туберкульозу обумовлюють різну сприйнятливість певного виду тварин до одного й того ж виду мікобактерій, а також стійкість до впливу зовнішніх факторів та високу адаптивну мінливість мікобактерій в організмі інфікованих тварин (паличкоподібні, кокоподібні, фільтруючі, L-форми). Тривалість неблагополуччя стада щодо туберкульозу та прояв епізоотичного процесу залежать від характеру процесу (гострий, підгострий, хронічний, латентний) [20, 23].

Спалахи інфекції можуть виникнути і без занесення збудника зовні, якщо в стаді є тварини з латентним перебігом інфекції, нерідко збудник може бути занесений із місць де він тривалий час перебував (поле, гноєсховище тощо). Повторне виникнення епізоотії туберкульозу після одужання можливе від декількох місяців до 4-х років. Результати досліджень показують, що у виникненні і розповсюдженні туберкульозу особливу роль відіграють стан імунної системи та біохімічний стан тварин. Ацидоз у великої рогатої худоби підвищує сприйнятливість організму до мікобактерій. Кислотостійкі мікобактерії в такому організмі знаходять сприятливі умови для свого розвитку [23, 30].

Таким чином, ігнорування розвитку туберкульозного процесу у телят може стати гальмуючим фактором в оздоровленні тваринницьких господарств від цієї небезпечної зооантропонозної інфекції [39, 44].

### **1.3. Інфекційний процес при туберкульозі у тварин**

Інфекційним процесом прийнято вважати взаємодію організму та патогенного мікроба в умовах довкілля, яка склалася еволюційно та

супроводжується явними або прихованими порушеннями постійності гомеостазу організму.

Проникнувши в організм з кормом або повітрям, туберкульозні мікобактерії потрапляють у легені або інші органи лімфогенним і гематогенним шляхами. На місці локалізації бактерій розвивається запальний процес з подальшим утворенням туберкульозних вузликів – туберкул величиною до сочевичного зерна, сіруватого кольору, округлої форми. У центрі туберкул відмерлі клітини під дією токсинів мікобактерії перетворюються на сирнистий масу. При доброякісному перебігу хвороби первинний осередок піддається звапнінню, оточується сполучною тканиною і подальший розвиток інфекційного процесу припиняється. При зниженні резистентності процес інкапсуляції збудника в первинному осередку виражений слабо, відбувається розплавлення стінок туберкульозного вузлика, мікобактерії потрапляють у здорову тканину, що призводить до утворення безлічі нових подібних туберкульозних вузликів (міліарний туберкульоз). Дрібні туберкульозні вузлики можуть зливатися між собою, утворюючи великі туберкульозні фокуси. З таких туберкульозних фокусів мікобактерії туберкульозу можуть потрапити у крів, що призводить до генералізації процесу і розвитку в різних органах (печінка, селезінка, нирки та ін) туберкульозних вогнищ різної величини. При генералізованій формі туберкульозу і обширних ураженнях легень настають виснаження і смерть тварини [39, 44].

Після проникнення в організм тварини, збудник туберкульозу аерогенними, аліментарним або іншим шляхом, на місці введення викликає запалення із колишньої тканини. Як і будь-яке запалення, туберкульозне характеризується альтерацією, ексудацією та проліферацією. Альтерація проявляється пошкодженням тканин аж до розвитку некрозів. Ексудація характеризується появою у зоні запалення серозного набряку, випаданням фібрину. Проліферацію розглядають як захисну і найбільш характерну реакцію організму при туберкульозі на патогенну дію збудника [38, 39, 44].

Прониклі в організм тварини мікобактерії фагоцитують мікрофаги, руйнуючи деякі з них. Переважно ліпідні та жирова фракції мікобактерій викликають в організмі специфічну тканинну реакцію з туберкульозних горбиків. Особливу роль у виникненні туберкульозних уражень відіграють воскоподібні складові оболонки. У розвитку інфекційного процесу при туберкульозі патогенетичну роль відіграють білки мікобактерій, які характеризуються антигенними та викликають в організмі ГЧСТ [39, 41].

Збудником туберкульозу при спонтанному зараженні тварин, інкубаційний період триває від 16 до 45 діб, інколи місяцями й роками, а при штучному зараженні – до 7 діб залежно від способу зараження, дози та вірулентності збудника.

Проникнувши в організм, збудник туберкульозу долає неспецифічні механізми і після попадання у міжклітинні щілини слизових оболонок лімфатичні вузли, селезінку та інші органи фагоцитується макрофагами та поліморфноядерними лейкоцитами, в яких мікобактерії можуть гинути або розмножуватись. Після потрапляння в органи навкруги місця розвитку збудника відбувається проліферація клітин і, як наслідок, формується сіруватого кольору вузлик (туберкул) або, так званий, первинний афект. У центрі вузлика виникає некроз клітин. Некротизована маса за консистенцією нагадує сир і тому її називають сирною або казеозною. В подальшому навкруги туберкула утворюється сполучнотканинна (ретикулярна) капсула, а у некротичній масі утворюються зерна вапна (петрифікація) [39, 40].

Процес формування первинного туберкульозного осередку відбувається одночасно з імунобіологічною перебудовою всього макроорганізму. У відповідь на дію збудника посилюється захисна функція нервової та ендокринної систем, підвищується бар'єрна функція тканин і органів, зростає знешкоджуюча функція печінки, підключаються імунологічні (індуцибельні) захисні механізми макроорганізму: розвивається ГЧСТ, проявляється підвищена чутливість негайного типу, обумовлена активацією В-системи лімфоцитів, розмноженням плазматичних клітин і



продукуванням ними специфічних антитіл (комплемента зв'язуючих, аглютининів, преципітинів та ін.) [34].

Залежно від імунобіологічного стану макроорганізму, у подальшому відбувається загоювання та петрифікація або прогресування первинного афекту. Від первинного туберкульозного осередку процес розповсюджується лімфатичним шляхом до регіонарних лімфатичних вузлів, де також розвиваються туберкульозні ураження. Уражені регіонарні лімфатичні вузли збільшені, щільні, на розрізі мають «променеподібний» вигляд і утворюють вузлики, заповнені казеозною масою, з відкладенням вапна. По ходу лімфатичних шляхів також спостерігається формування продуктивних туберкульозних горбиків (вузликів). Описані компоненти становлять первинний туберкульозний комплекс [35, 39].

У значній мірі локалізація первинного туберкульозного комплексу залежить від віку інфікованої тварини. У дорослої великої рогатої худоби переважає аерогенний шлях зараження і первинний комплекс знаходиться в легенях та регіонарних (бронхіальних та мезентеріальних) лімфатичних вузлах. Телята заражаються здебільшого аліментарним шляхом і первинний комплекс знаходиться частіше у травному тракті. Перебіг туберкульозу і його прояв залежить від вірулентності збудника, часу і періодичності попадання його в організм та резистентності макроорганізму. В організмі тварин наявність збудника туберкульозу не завжди супроводжується розвитком видимих уражень. Наявність мікобактерій туберкульозу в організмі у прихованому стані називають латентним мікробізом [8, 39, 41].

#### **1.4. Діагностика туберкульозу**

*Методи зажиттєвої і диференційної діагностики туберкульозу.* Мінливість типових і атипових мікобактерій, епідемія туберкульозу ускладнили не тільки епізоотичну ситуацію, але й зажиттєву діагностику мікобактеріальної інфекції у тварин. З'являються гостро прогресуючі форми

хвороби та виділення від хворих тварин мікобактерій із зміненими морфофункціональними властивостями. Завдяки цьому та зміни імунного статусу тварин в останні роки все більше з'являється публікацій щодо недосконалості загальноприйнятого методу діагностики туберкульозу – алергічної туберкулінової проби та лабораторних досліджень [12, 22].

Згідно діючої «Інструкції про заходи з профілактики та оздоровлення тваринництва від туберкульозу» та «Міжнародного ветеринарного кодексу МЕБ», основним методом захиттевої діагностики туберкульозної інфекції у великої рогатої худоби є туберкулінова проба [16, 20].

Відомі більш ніж вісім методів туберкулінової проби: внутрішньошкірна, очна, інтрапальпебральна та пальпебральна, ринореакція, уретро- і вагінальна реакція, реакція на туберкулін на слизовій оболонці прямої кишки, епідермальні реакції, внутрішньовенна, внутріньочеревна та інші. Але не всі вони знайшли практичне використання. На цей час не втратили свого діагностичного значення внутрішньошкірна, очна та внутрішньовенна туберкулінові проби.

Для диференційної діагностики рекомендується використовувати повторне дворазове введення ППД-туберкуліну для ссавців тільки реагуючим тваринам. При цьому друге введення ППД-туберкуліну для ссавців проводять, відступивши від місця розвинутої реакції не менше 7-10 см вперед, а з протилежного боку симетрично вводять ППД-туберкулін для птахів або КАМ. Реакції оцінюють через 48 годин. Тварин, у яких збільшення шкіряної складки на ППД-туберкулін для ссавців більше, ніж на ППД-туберкулін для птахів (КАМ) піддають забою, інших залишають в гурті до чергового профілактичного дослідження.

У наші часи практична ветеринарна медицина гостро потребує розробки і впровадження простих і високоефективних методів діагностики. Серед новітніх методів особливе місце посідає імуноферментний аналіз. Діагностична ефективність ІФА за даними одних авторів досягає 80-85 %, за іншими – 68,9-75,7 % [3, 5, 8].

Традиційні методи виявлення збудника туберкульозу не задовольняють вимоги практики. Бактеріологічні дослідження методом висіву довготривалі (1-3 міс.), а бактеріоскопічний метод дослідження мазків, пофарбованих за методом Ціля-Нільсена або люмінесцентними барвниками, дозволяє проводити мікобактерій при наявності в 1 мл досліджуваного матеріалу  $10^5$  -  $10^6$  та  $10^4$  -  $10^5$  мікробних тіл відповідно [26, 38].

В останні часи набули широкого поширення методи, об'єднані поняттям генодіагностика. Одним з таких методів є полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). На сьогодні є ряд розробок щодо використання цього методу в діагностиці туберкульозу [26].

Стосовно чутливості ПЛР літературні дані є суперечливими. Так, автори полімеразної ланцюгової реакції вважають, що цей діагностичний тест є високоспецифічним і високочутливим та є альтернативою мікробіологічних досліджень. В той же час, цей метод порівнюють за чутливістю до біологічного. Разом з тим, за даними ряду авторів, метод ПЛР виявив недостатню чутливість у порівнянні з культуральним методом за умови використання двох або трьох живильних середовищ для посіву досліджуваного матеріалу [40, 44].

Незважаючи на активний пошук новітніх методів, світова ветеринарна спільнота рекомендує використовувати для зажиттєвої діагностики лише туберкуліновий тест.

*Посмертні (післязabійні) методи діагностики туберкульозу.* У великої рогатої худоби посмертні методи діагностики туберкульозу мають особливе значення при первинній оцінці епізоотичної ситуації. Захворювання вважається встановленим, якщо у реагуючих (або не реагуючих) на туберкулін тварин при розтині знайдено властиві туберкульозні ураження або у випадку виділення з досліджуваного матеріалу *M. bovis* або *M. tuberculosis*, а також при позитивних результатах біологічної проби.

Завдяки патолого-анатомічного методу діагностики встановлюють діагноз при загибелі тварин та при забої реагуючих на туберкулін тварин з

діагностичною метою. Патолого-анатомічні зміни у великої рогатої худоби характеризуються різноманітністю і переважно залежать від вірулентності збудника, імунологічного статусу організму та давності інфекційного процесу.

Роль патолого-анатомічного методу зростає в зв'язку з виявленням масових неспецифічних реакцій на туберкулін у тварин в благополучних щодо туберкульозу господарствах, викликаних атипovими мікобактеріями та іншими факторами. Найбільш ефективним методом первинної діагностики туберкульозу великої рогатої худоби залишається післязабійний огляд туш і внутрішніх органів на м'ясокомбінатах і забійних пунктах з наступним бактеріологічним дослідженням біоматеріалу.

Найчастіше уражуються внутрішні органи (легені, печінка, селезінка, нирки інші), лімфатичні вузли, вим'я, кісткова тканина, суглоби.

Розрізняють первинне та вторинне туберкульозне ураження. Первинне ураження буває на місці потрапляння збудника хвороби в організм тварини і, насамперед, в органах, найбільш сприйнятливих для його розвитку. Як вказує збільшені і мають горбкуватий вигляд. При розрізі туберкульозних пухлин видно щільні осередки сірого або жовтуватого кольору, які складаються з сироподібної маси або мають вигляд гнійних факусів блідо-жовтого кольору. Ураження легень часто супроводжується перлинницею, серозно-фібринозним плевритом. Туберкульозні ураження можуть бути в різних частинах тіла, тканинах та органах. При генералізованому туберкульозному процесі нерідко спостерігається туберкульоз кісток та суглобів. У тварин частіше інших кісток уражуються ребра, які потовщуються в окремих місцях. Суглоби при туберкульозі набрякають і стають болючими [6, 7, 29].

Біологічна проба на тваринах залишається найбільш чутливим діагностичним методом виявлення патогенних мікобактерій і є основним в дослідженнях з визначення їх типів, вірулентності та вивченні атипovих культур.

## 1.5. Заходи боротьби з туберкульозом

Заходи боротьби з туберкульозом великої рогатої худоби до кінця XIX століття велись безсистемно. Після вивчення етіології туберкульозу (1882 р.) та початку використання туберкулінодіагностики (1891 р.) розпочались пошуки організаційних систем оздоровлення неблагополучних господарств.

З ліквідації туберкульозу історія організаційних заходів знає декілька методів: метод Банга, Остертага, американський та радянський методи. Останній базується на створенні ізоляторів для реагуючих на туберкулін тварин та скороченні строків проведення туберкулінізації і використання внутрішньошкірної й очної туберкулінових проб [44].

Найбільш науково обґрунтованим є перший спосіб проведення оздоровчих заходів на час його запровадження (1892 р.) був. В подальшому він став прототипом, на основі якого розроблялися інші системи протитуберкулінових заходів. Банг, при проведенні протитуберкульозних заходів, пропонував проводити: систематичні клінічні і алергічні дослідження; здавання на забій тварин з клінічними ознаками туберкульозу; ізоляцію реагуючих на туберкулін та їх забій після відгодівлі; випоювання стерилізованого молока телятам. Остертаг запропонував, так званий, «щадящий» метод оздоровлення неблагополучних з туберкульозу великої рогатої худоби господарств. На відміну від методу Банга, даний метод передбачав: проведення діагностики туберкульозу за даними клінічних обстежень двічі на рік; бактеріологічне дослідження молока корів; здавання на забій тварин з клінічним проявом інфекції; телят в післямолозивний період піддіють туберкулінізації, реагуючих вибраковують [45, 47].

В країнах, де використовували метод Остертага, досягнути ефективний оздоровчих заходів не вдавалося і, як наслідок, з 1952 року в ФНР розроблено нову систему оздоровлення великої рогатої худоби від туберкульозу, використавши методичний підхід Банга. У США, в 1917 році була розроблена система по боротьбі з туберкульозом великої рогатої худоби

і свиней, яка передбачала етапність досягнення мети шляхом створення незаражених зон і стад. При цьому в основу діагностики була покладена туберкулінова проба, яку ставили з інтервалом у 60 днів. Акредитованими стадами вважались ті, які протягом 12-14 місяців отримували негативні результати досліджень.

На території України, в основу проведення протитуберкульозних заходів був використаний метод Банга в модифікації радянських вчених. В перші 20 повоєнних років в Україні діагностика туберкульозу у великої рогатої худоби базувалась на регулярних епізоотологічних обстеженнях, алергічних дослідженнях за допомогою туберкуліну, а також клінічних, лабораторних і патолого-анатомічних дослідженнях. Тварин з клінічними формами туберкульозу негайно вибраковували, а регуючих на внутрішньошкірне введення туберкуліну тимчасово утримували в ізольованих приміщеннях або направляли в туберкульозні ізолятори для тимчасового використання [30, 34, 44].

З кінця 60-х років минулого століття система протитуберкульозних заходів в країні здійснюється в наступних напрямках:

- організації обмежувальних ветеринарно-санітарних заходів;
- оздоровлення неблагополучних щодо туберкульозу стад великої рогатої худоби шляхом повної заміни або системи алергічних діагностичних досліджень з наступним забоєм реагуючих на туберкулін тварин;
- вирощуванням здорового і вільного від туберкульозу молодняку;
- знезаражування молока і об'єктів зовнішнього середовища.

Ці положення були викладені в інструкції, затвердженій у 1970 році, наступних інструктивних актах та останній «Інструкції про заходи з профілактики та оздоровлення тваринництва від туберкульозу» (1994).

На основі цих та інших організаційних методів проводиться ефективна боротьба з туберкульозом великої рогатої худоби як в Україні, так і країнах СНД. Аналізуючи літературні джерела можна стверджувати, що існуюча система оздоровчих і профілактичних заходів не завжди дає позитивні

результати [11, 14, 21].

Це пов'язано з: недосконалістю існуючих методів захиттєвої діагностики туберкульозу;

- відсутністю специфічних засобів імунопрофілактики;
- недостатнім знанням епізоотологічних особливостей та екології збудника туберкульозу;
- генетичною та фенотипічною мінливістю мікобактерій туберкульозу;
- ареактивністю деяких тварин, в тому числі і телят, до туберкуліну.

Серед причин довготривалого неблагополуччя особливе місце відводиться молодняку, який не завжди вчасно досліджують на наявність інфекції за допомогою алергічної туберкулінової проби і має місце розвиток латентного мікроорганізму та стану анергії [12, 13, 26].

Сучасні протитуберкульозні заходи в Україні здійснюються на основі «Інструкції про заходи з профілактики та оздоровлення тваринництва від туберкульозу» [16]. У відповідності з цим документом система протитуберкульозних заходів передбачає:

- профілактику інфекції за допомогою ранньої її діагностики внутрішньошкірною туберкуліновою пробою і недопущення завезення тварин з неблагополучних або не перевірених щодо туберкульозу стад у благополучні господарства;

- оздоровлення неблагополучних стад методом систематичних, з інтервалом 45-60 днів, діагностичних алергічних досліджень і забоєм всіх реагуючих на туберкулін тварин і їх нащадків та методом повної заміни неблагополучних стад;

- знезараженням молока та молочних відвійок;
- проведення ветеринарно-санітарних та організаційних заходів.

Найбільш радикальним оздоровчим методом є повна заміна неблагополучних стад тваринами, завезеними із господарств, вільних від туберкульозної інфекції та проведення комплексу ветеринарно-санітарних заходів.

## 2. ВЛАСНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

### 2.1. Матеріали та методи досліджень

Роботу виконували в навчальній лабораторії кафедри епізоотології та інфекційних хвороб Дніпровського державного аграрно-економічного університету за безпосередньої допомоги аспірантки кафедри Аліфонової К.В., за що висловлюємо щіру подяку.

Для експериментів по встановленню прояву інфекційного процесу туберкульозу у морських свинок за прямих пасажів на початку досліджу використали субкультуру швидкорослого 1-го та цього варіанту повільнорослого 100-го пересіву *M. bovis*: культури мікобактерій були отримані за пересівів через живильне середовище Левенштейна-Йєнсена з рН 7,1.

На початку готували мазки з відібраних для досліджу субкультур та вивчали під імерсійною системою морфологію та кислотостійкість мікобактерій.

*Для проведення досліджень готували робочий розчин фуксину:*

1,0 г основного кристалізованого фуксину розтирали у ступці з 5,0 г кристалізованої карболової кислоти та 0,5 см<sup>3</sup> гліцерину, додаючи невеликими порціями 10,0 см<sup>3</sup> 96 %-вого етилового спирту. Потім суміш перемішували додаючи 100 см<sup>3</sup> дистильованої води (фенол розплавляли шляхом підігрівання). Розчин фільтрували через паперовий фільтр і зберігали у флаконах з темного скла з притертою пробкою.

*Для знебарвлення використовували один із реактивів:*

1. 3 %-вий солянокислий спирт: 3 см<sup>3</sup> концентрованої соляної кислоти за ДОСТ 3118-77 додавали до 97 см<sup>3</sup> 96 %-вого етилового спирту;

2. 25 %-вий розчин сульфатної кислоти: 25 см<sup>3</sup> концентрованої сульфатної кислоти додавали до 75 см<sup>3</sup> стерильної дистильованої води. Кислоту нашаровували по стінці посудини на воду.



*Для одержання метиленового синього (дофарбовуючий розчин).*

30 см<sup>3</sup> насиченого спиртового розчину метиленової синьки (8-9 г кристалізованої синьки в 100 см<sup>3</sup> етилового спирту) фільтрували через паперовий фільтр, додавали 1 см<sup>3</sup> 1 %-вого розчину їдкого калію (КОН) та розчиняли в 100 см<sup>3</sup> дистильованої води.

Усі приготовлені розчини промакували: на етикетці вказували назву реактиву (барвника), дату приготування і термін зберігання. Усі розчини зберігали за кімнатної температури протягом 6-12 міс. у темному місці в герметично закритих посудинах з темного скла.

В наступному мазки розміром 2x1 см або 3x2 см готували у вигляді відбитків або шляхом розтирання біологічного (патологічного) матеріалу між чистими предметними скельцями, чи шляхом нанесення на скельце завису (суспензії біологічного матеріалу) мікобактерій бактеріологічною петлею. Для дослідження готували по два мазки з кожного органа, лімфатичного вузла чи загальний зі суспензії мікобактерій, яку приготували для посіву. Усі дані про мазок відповідали лабораторному реєстраційному журналу; їх наносили на один кінець скла перед приготуванням мазка за допомогою незмивального маркера. На одне скло наносили лише один мазок. За цього не торкалися чистої поверхні скла руками. Якість правильного приготування визначали шляхом читання газетного тексту на відстані 5-10 см.

Мазки висушували на повітрі за кімнатної температури, уникаючи потрапляння на мазки сонячного світла. З метою фіксації скло (висушеним мазком догори) за допомогою пінцета повільно проводили через верхню третину полум'я спиртівки (пальника) 2-3 рази по 2-3 с. Перевірку якості фіксації, проводили шляхом торкання нижньою поверхнею скла тильної поверхні кисті відразу ж після видалення його з полум'я до появи відчуття інтенсивного, але приємного тепла чи візуально – до зникнення ознак запотівання скла. Фіксовані (охолоджені) мазки розміщували на містку для фарбування на відстані 1 см між ними (маркування скла спрямовували в один бік). Висушені й фіксовані мазки фарбували відразу, нефіксовані – не

залишали відкритими, оскільки це збільшує небезпеку розповсюдження збудника інфекції.

*Для оцінки й обліку результатів бактеріоскопічного дослідження перед мікроскопічним дослідженням перевіряли технічну здатність мікроскопа. Паперовою серветкою або марлевим тампоном, змоченим спиртоєфірною сумішшю, протирали лінзи об'єктивів мікроскопа і предметний столик переконуючись в тому, що пофарбовані препарати добре висушені. У ході роботи недопускали зіткнення фронтальної лінзи об'єктива з предметним склом, з метою запобігання псуванню лінзи чи препарату.*

Пофарбований препарат досліджували за допомогою імерсійного об'єктива світлового мікроскопа. При цьому пам'ятали, що крапля імерсійної олії має падати на препарат вільно (піпетка й імерсійний об'єктив не повинні стискатися з мазком, щоб уникнути перенесення кислотостійких бактерій з одного мазка на інший). Мазок вивчали за однією схемою в одному напрямку: по поздовжній осі скла зліва направо або вертикально згори донизу (у такому разі переконувалися, що жодне поле зору не переглядатиметься повторно).

Переглядали 100 полів зору 5 хв: це дає можливість виявити навіть поодинокі мікобактерії. Якщо за такого дослідження мікобактерій не виявлено, то цей матеріал оцінювали як негативний. Коли ж у мазку мікобактерії виявляли, то більше не переглядали весь мазок – достатньо 20-50 полів зору для оцінки його як позитивного. Крім встановлення наявності в мазку кислотостійких бактерій обов'язково давали їх кількісну оцінку.

Проте на підставі бактеріоскопічного дослідження можна зробити висновок тільки про наявність чи відсутність у препараті кислотостійких чи некислотостійких мікобактерій та їх кількість. Негативний результат не виключає діагнозу на туберкульоз, оскільки в досліджуваному матеріалі може міститися менше мікобактерій, ніж можна виявити методом мікроскопії.

Інформацію про результати мікроскопічного дослідження заносили до лабораторного реєстраційного журналу. Після запису усі мазки зберігали

протягом 3 місяців. У спеціальних коробках у тому самому порядку, в якому їх зареєстровано в лабораторному журналі.

Після закінчення цього терміну всі скельця знищувалися (не використовувалися повторно).

Для проведення культуральних досліджень, виділення культури мікобактерій, навіть за негативного результату мікроскопічних досліджень, готували живильне середовище Левенштейна-Йєнсена за наступним прописом:

*Сольовий розчин:*

- ◆ калій фосфорнокислий однозаміщений ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) – 1,54 г;
- ◆ магній сірчано-кислий ( $\text{MgSO}_4$ ) – 0,15 г;
- ◆ натрій лимоннокислий ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \text{Na}_3 \times n\text{H}_2\text{O}$ ) – 0,38 г;
- ◆ амоній азотно-кислий ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) – 5,0 г;
- ◆ гліцерин ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ ) – 6,0  $\text{cm}^3$ ;
- ◆ малахітовий зелений ( $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_2$ ) 2 %-вий – 0,3  $\text{cm}^3$ ;
- ◆ яєчна маса – 670,0  $\text{cm}^3$ ;
- ◆ вода дистильована — до 1000,0  $\text{cm}^3$ ;
- ◆ рН середовища доводили до 7,1 (соляною кислотою).

Для проведення бактеріологічного дослідження підготовлений для дослідження матеріал висівали на живильне середовище 6 пробірок. Посів проводили бактеріологічною петлею, обережно втираючи матеріал по всій поверхні живильного середовища. Пробірки з висіяним зависом мікобактерій викладали у нахиленому положенні та поміщали у термостат за температури 37-38 °С.

Через 2 доби посіви оглядали і визначали колір середовища. Якщо він не відновився, обробку й посів повторювали. Пробірки, на середовищі яких з'явився ріст сторонньої мікрофлори, видаляли, а інші – закривали резиновими пробками і лишали для подальшого культивування (37 °С).

Для виявлення початкового росту мікобактерій всі пробірки з посівами оглядали перший тиждень щодня, а в подальшому – один раз на тиждень

протягом 28 днів.

За наявності колоній або наприкінці спостереження без їх наявності готували та оглядали мазки з поверхні живильного середовища і незалежно від результатів мікроскопії проводили пересіви на свіже живильне середовище.

Пересіви витримували протягом 28 днів та аналізували один раз на тиждень ріст колоній.

Облік результатів росту культур мікобактерій проводили у разі виділення та накопичення культур мікобактерій. Морфологічні ознаки, тинкторіальні, культуральні властивості вивчали за певною схемою.

1. Строки виявлення первинного росту.
2. Інтенсивність росту: слабкий, помірний, пишний.
3. Характер росту: росинчастий, наліт, димка, окремі колонії, їх скупчення, суцільний ріст.
4. Характеристика колоній:
  - кількість: поодинокі, численні;
  - величина: дрібні, середні, великі;
  - форма: правильна, неправильна, з нерівними, зубчастими краями;
  - поверхня: гладка (S-форма), шорстка (R-форма), зморшкувата, складчаста, суха, волога;
  - консистенція: крихкувата, в'язка, слизова, волокниста;
  - пігментоутворення: непігментовані, пігментовані (колір);
  - прозорість: прозорі, напівпрозорі, матові;
  - емульгованість у фізіологічному розчині: задовільна, слабка, відсутня.
5. Тинкторіальні властивості у фарбуванні за Ціль-Нільсеном (кислотостійкі, некислотостійкі), Грамом (позитивні – фіолетові, і негативні – червоні).
6. Морфологія мікобактерій:
  - довжина: довгі, короткі, кокоподібні;
  - товщина: товсті, тонкі;

- форма: прямі, вигнуті, гіллясті, ниткоподібні, розташовані під кутом;
- кінці: заокруглені, загострені, із вздуттям;
- зернистість: виражена, відсутня;
- розташування: поодинокі, невеликі скупчення, купки.

Для проведення біологічної проби брали морських свинок масою тіла 250-300 г. Перед дослідом тварини витримували в карантині не менше двох тижнів протягом яких проводили алергічні дослідження з метою виключення у підібраних для експерименту дослідних тварин спонтанного туберкульозу.

Для проведення туберкулізації у морських свинок на боці вищипували шерсть, шкіру на цьому місці дезінфікували 70° етиловим спиртом та внутрішньошкірно вводили ППД-туберкулін для ссавців в дозі 25 МО і об'ємі 0,1 см<sup>3</sup> стерильного ізотонічного розчину. Результати реакції враховували через 24 та 48 годин. У хворих чи заражених патогенними мікобактеріями тварин реакція проявляється у вигляді гіперемії шкіри в місці введення туберкуліну та утворення ущільненої припухлості діаметром 5 мм та більше, іноді з некрозом центру.

Для зараження тварин на першому етапі дослідів готували завис мікобактерій. Накопичену на щільному середовищі Левенштейна-Йенсена бактеріальну масу мікобактерій знімали бактеріологічною лопаткою, віджимали між листками фільтрувального паперу, зважували на торсійних вагах, поміщали в стерильну ступку і ретельно розтирали з невеликим об'ємом фізіологічного розчину. Додаючи фізіологічний розчин, завис доводили до необхідної концентрації (1 мг/см<sup>3</sup> фізіологічного розчину).

Завис мікобактерій в дозі 1 мг/см<sup>3</sup> фізіологічного розчину вводили підшкірно з внутрішньої сторони стегна кожній з п'яти морським свинкам конкретного пасажу. Ділянку ін'єкції звільняли від шерсті та знезаражували 70° етиловим спиртом. По закінченню досліду при евтаназії, після загибелі морських свинок в період 90 діб досліду, проводили патолого-анатомічний розтин, аналізували зміни, готували суспензію зі шматочків селезінки, легень лімфатичних вузлів тощо та вводили наступним п'яти не реагуючим на ППД-

туберкулін для ссавців морським свинкам, так до 10 пасажу.

Дослід проведено з *M. bovis*, які 10 разів пасажувалися через штучне живильне середовище Левенштейна-Йенсена та з цим же штамом (субкультурою) пасажованим через таке ж середовище 100 разів. Ступінь ураження оцінювали за методом Тріуса.

*Приготування суспензії з біологічного матеріалу дослідних тварин та завису мікобактерій культури для зараження тварин.* Для приготування завису з мікобактерій 8-10 мг бактеріальної маси знімали шпателем з поверхні щільного живильного середовища та переносили у стерильний пеніциліновий флакон з гумовою пробкою, який попередньо зважили. Потім флакон знову зважували на аналітичних вагах і за різницею у вазі між першим та другим зважуванням флакона визначали кількість відібраної культури мікобактерій. До флакона з 1 см<sup>3</sup> бактеріальної маси додавали рівну кількість ізотонічного розчину.

Суспензію з біологічного матеріалу, який відібрали від тварин і підготували для посіву на середовища нейтралізували стерильним 10%-вим розчином двовуглекислого натру протягом 15 хв, відстоювали до осідання великих частинок. Надосадову рідину, яка утворилася, використовували для ін'єкції лабораторним тваринам. Для одержання однієї дози суспензії (1 см<sup>3</sup>) використовували 1 г матеріалу (який відбирали на межі патолого-анатомічно зміненої і незміненої тканини).

*Проведення біологічної проби.* Дослідження біологічного матеріалу (суспензії) проводили на п'ятьох морських свинках кожного чергового пасажу. Суспензію матеріалу попередньо розводили 1:10 стерильним ізотонічним розчином і в об'ємі 1 см<sup>3</sup> вводили морським свинкам підшкірно в ділянці паху.

Сенсибілізувальні властивості досліджуваних штамів в динаміці пасажів вивчали за допомогою алергічного методу на морських свинках за вище наведеною методикою.

Після загибелі морських свинок проводили патолого-анатомічні

дослідження за загальноприйнятими правилами.

Ступінь змін оцінювали за схемою М.С. Тріус. При цьому визначали специфічні ураження як окремих органів, так і всього організму у цифрових показниках – індексах. Зміну в органах і лімфатичних вузлах інфікованих свинок оцінювали плюсами:

“+” – поодинокі вузлики;

“++” – декілька вузликів;

“+++” – чисельні вузлики.

При переведенні позначень, виражених плюсами, у цифрові показники користувалися слідуючою схемою:

для лімфатичних вузлів кожний плюс оцінювали – 1;

селезінки – 2;

печінки – 3;

легень – 4.

Зміни в цих органах, виражені в цифрових показниках, підсумовували та визначали як індекс ураження. При максимальних специфічних змінах індекс ураження за цією схемою дорівнює 30.

В якості контролю використали біологічний матеріал (легені, селезінка, лімфатичні вузли) морських свинок, які загинули після зараження зависом *M. bovis* та 100-ої субкультури на початку експерименту. Для цього патолого-анатомічно змінені органи морських свинок витримували в замороженому стані 20-ть місяців до 10-го та шостого пересіву. Перед 10-им та шостим пасажем матеріал розморожували, готували суспензію та заражали п'ять морських свинок. В другому контролі використали культуру *M. bovis* одержану за першого дослідження біологічного матеріалу як в першому так і другому досліді. Для цього кожні 1,5-3 місяці з одержаних культур готували завис мікобактерій і пересівали на свіже живильне середовище Левенштейна-Йенсена шести пробірок – на 10-му та шостому прямому пасажі першого та другого досліді готували завис і заражали п'ять морських свинок. Всього в досліді використано 100 морських свинок.

Інтенсивність росту субкультур за пересіву на живильне середовище оцінювали шляхом підрахунку колоній сформованих на 7, 14, 21 та 28-ту добу культивування.

Аналогічні контролю були проведені і в експерименті з культурою 100-го пересіву, тобто 1) біологічний матеріал одержаний після першого зараження морських свинок зависом досліджуваних *M. bovis* витримували в замороженому стані 15 місяців з наступним розморожуванням, приготуванням суспензії та зараженням свинок паралельного (одночасно) шостому прямому пасажу; 2) завис *M. bovis* приготовлений з колоній сформованих після висіву суспензії з органів морських свинок першого пасажу 100-ої субкультури висівали та пасажували через щільне живильне середовище Левенштейна-Йєнсена кожні 2,5-3 місяці і на шостому пасажі одержаною субкультурою (зависом мікобактерій приготуванням за наведеною раніше методикою) заражали (паралельно прямому шостому пасажу) п'ять морських свинок. Для вивчення ліпідів *M. bovis* культивованих в динаміці пасажів через щільне живильне середовище Левенштейна-Йєнсена (рН 7,1) використали субкультури 2, 59 та 100-го пересівів.

## 2.2. Характеристика навчальної лабораторії

Навчальна лабораторія є складовою частиною кафедри епізоотології і інфекційних хвороб тварин, яку очолює професор, доктор ветеринарних наук Ткаченко О.А., вона спрямована на розвиток науково-дослідницької та навчально-методичної діяльності кафедри та університету.

Основними завданнями лабораторії є вивчення мікобактерій бичачого виду, дослідження його складу та визначення вірулентності.

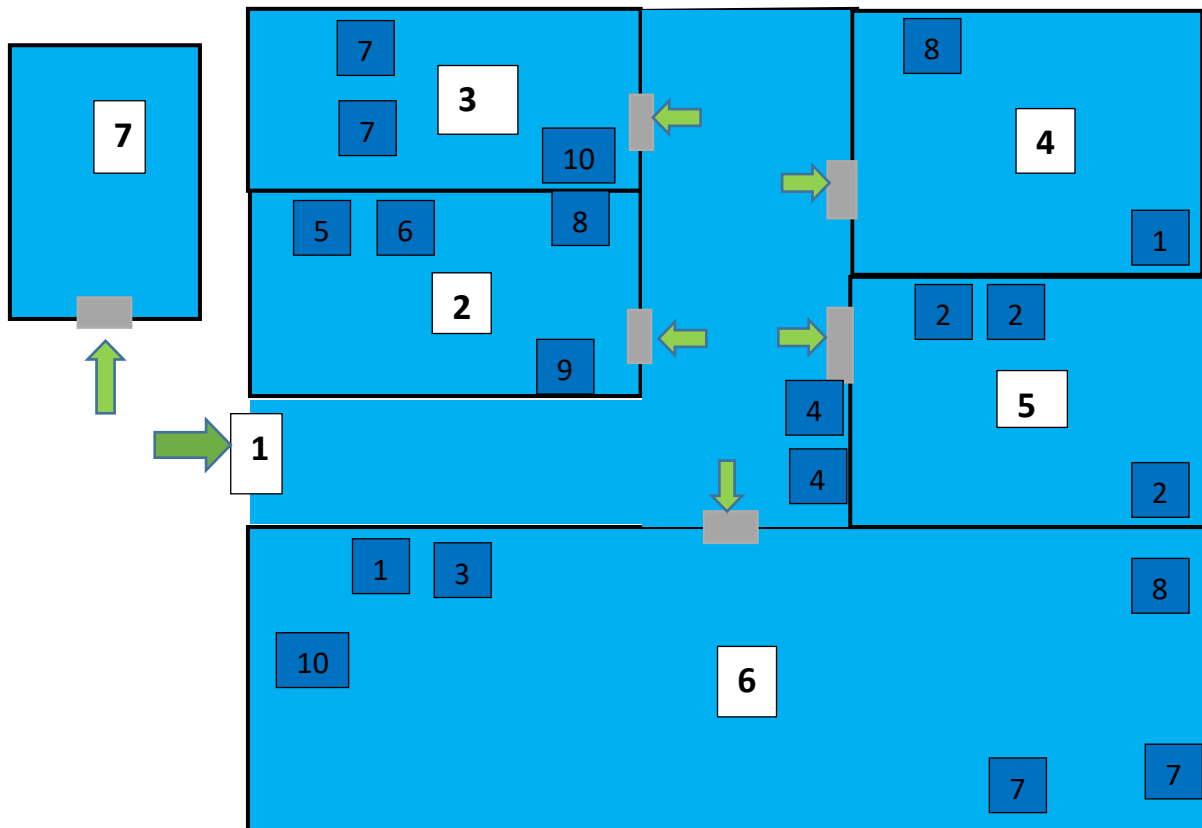
До обов'язків завідувача лабораторії входить: визначення порядку, виконання конкретних заходів на виконання наказів та розпоряджень завідувача кафедрою, розподілення обов'язків працівників, забезпечення оперативного та достовірного ведення досліджень, також завідувач



лабораторією несе відповідальність за виконання покладених на лабораторію завдань і функцій.

Навчальна лабораторія знаходиться з торцевої сторони корпусу факультету ветеринарної медицини, має окремий вхід. Територія огорожена парканом та озеленена, також вона має свою матеріально-технічну базу та віварій.

План лабораторії наведено на рисунку 1.



**Рис 1. Схема лабораторії кафедри епізоотології та інфекційних хвороб тварин Дніпровського державного аграрно-економічного університету**

1 – вхід; 2 – стерильний бокс; 3 – кабінет завідувача; 4 – автоклавна №2; 5 – термостатна; 6 – автоклавна №1; 7 – віварій.

Прилади: 1 – автоклав; 2 – термостат; 3 – сушильна шафа; 4 – холодильник; 5 – бокс; 6 – рН-метр; 7 – робочий стіл; 8 – умивальник; 9 – лампа УФ-випромінювання; 10 – шафа для приладів.

В лабораторії наявне наступне обладнання: автоклави – 2 шт., термостат ТС-80-СПУ, термостат охолоджуючий, холодильник Д 2 МС –

2 шт., сушильна шафа, рН-метр, лампа УФ-випромінювання – 2 шт., бокс для роботи з культурами, мікроскоп «Биолам Л-2», а також мікробіологічне обладнання та посуд, хімічні реактиви, барвники.

В лабораторії займаються бактеріологічними, біохімічними, патолого-анатомічними та біологічними дослідженнями.

Лабораторія складається: кабінет завідувача, автоклавна, термостатна, кімната для бактеріологічного дослідження з стерильним боксом, санітарна кімнати та віварій, що знаходиться в окремому приміщенні.

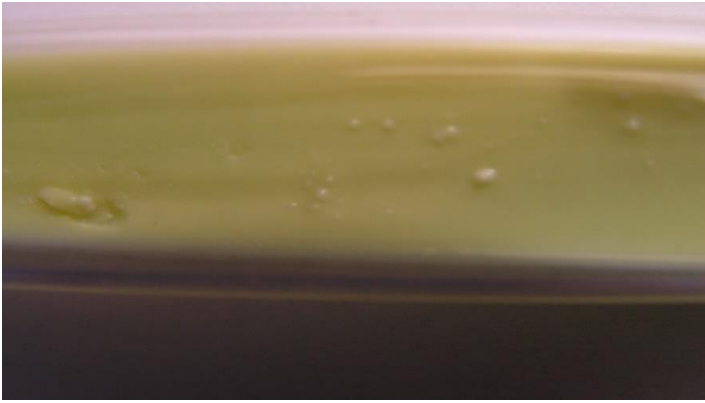
В автоклавній кімнаті розташований автоклав, сушильна шафа, умивальник, шафа для реактивів та чистого лабораторного посуду, два холодильника, стіл для патолого-анатомічних досліджень. Термостатна облаштована двома термостатами та шафою для зберігання чистого посуду. Кімната для бактеріологічного дослідження оснащена шафою з реактивами, столом з необхідним для приготування мазків, стерильним боксом. В кабінеті завідувача знаходяться два стола, де зберігається вся документація та ведуться журнали.

Біля лабораторії знаходиться віварій з піддослідними тваринами. Віварій надійно ізольований, для попередження зараження хворобами. Вхід до віварію особам, які не пов'язані з роботою у лабораторії забороняється.

Всі проведенні дослідження та їх результати реєструються у журналі обліку культур.

### **2.3. Результати власних досліджень та їх аналіз**

**Вивчення культуральних властивостей дослідних *M. bovis*.**  
Провівши висів підготовленого завису на живильне середовище Левенштейна-Йенсена та оцінивши характер росту встановлено наступне (рис. 2).

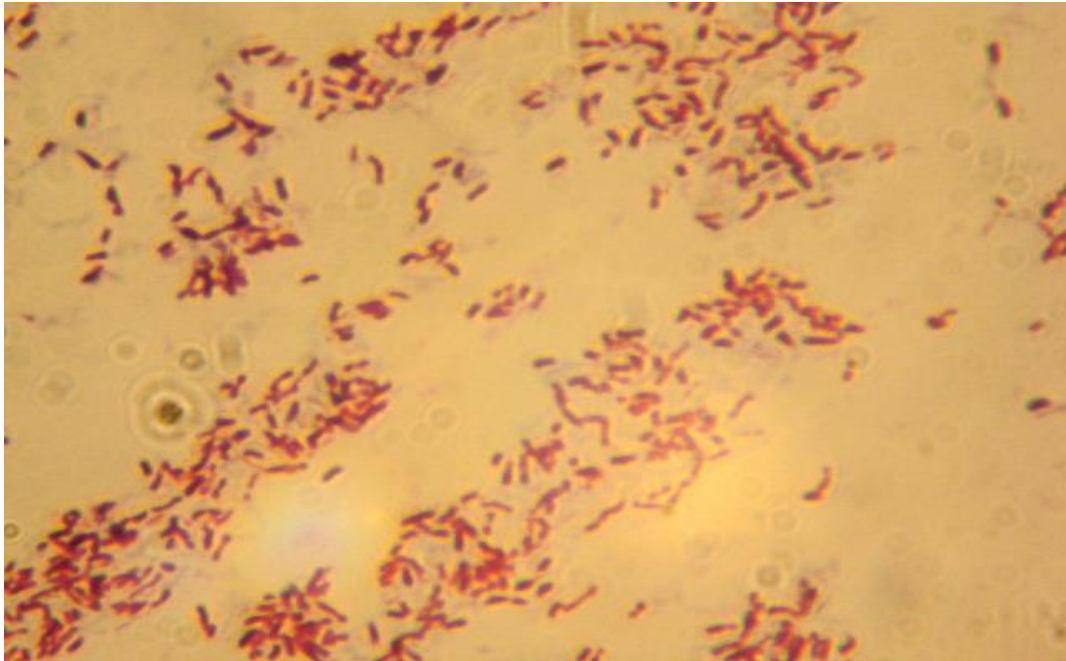


**Рис. 2. Культуральні властивості вірулентних *M. bovis***

Ріст окремо сформованих колоній кольору слонової кістки по лінії висіву завису мікобактерій відмічено на третю добу з наступним збільшенням їх кількості та величини колоній, які мали S-форму.

**Дослідження тинкторіальних властивостей та морфології дослідних мікобактерій під імерсійною системою.**

Приготувавши мазок з одержаних колоній під імерсією виявлено (рис. 3) короткі (2-3 x 0,2 мкм), з заокругленими кінцями палички червоного кольору.



**Рис. 3. Морфологія та тинкторіальні властивості патогенних *M. bovis***

**Вивчення вірулентності *M. bovis*.**

Для цих досліджень використали дві морські свинки масою тіла 250-300 г та дослідний патогенний варіант мікобактерій в дозі 1 мг зі

встановленими вище культурально, тинкторіальними властивостями та морфологією. В результаті проведення біологічної проби (підшкірне зараження зависом швидкорослих *M. bovis* першої субкультури) встановлено, що морські свинки реагували на ППД-туберкулін для ссавців на 30-ту добу досліду (рис. 4).



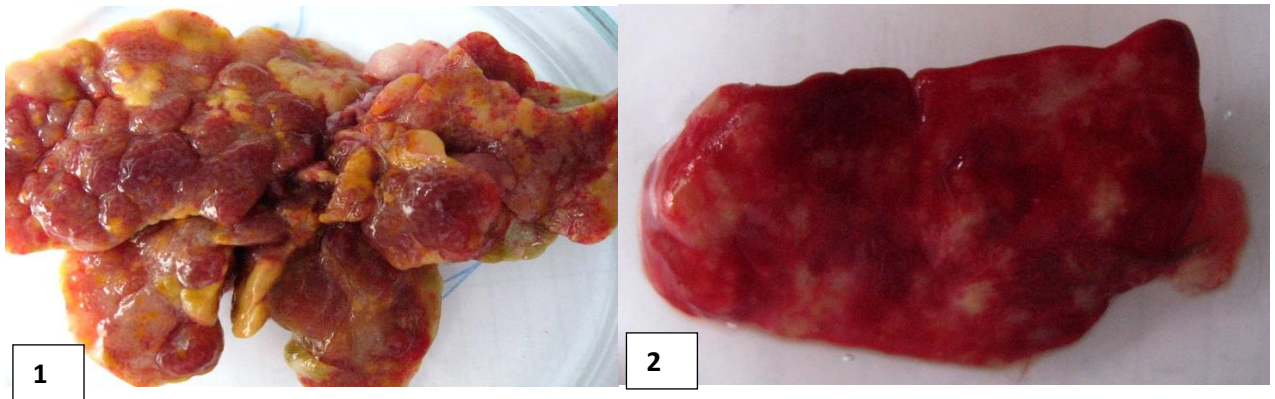
**Рис. 4. Алергічна реакція на ППД-туберкулін для ссавців у морської свинки, зараженої патогенними *M. bovis***

Утворення виразки (рис. 5) в ділянці введення завису мікобактерій на 20-ту добу від початку експерименту та загибель на 65-ту та 75-ту добу.



**Рис. 5. Виразка в місці введення завису патогенних мікобактерій**

Провівши патолого-анатомічний розтин загиблих морських свинок встановлено (рис. 6) наявність генералізованої форми туберкульозу: ураження легень, бронхіальних, середостінних лімфовузлів, печінки, селезінки, кишківника.



**Рис. 6. Патолого-анатомічні зміни за туберкульозу морських свинок: 1 – легені; 2 - селезінка**

Зміни характеризувалися сіро-жовтими вогнищами різної форми та розмірами. Цими дослідженнями встановлено, що *M. bovis* патогенні для морських свинок, які гинуть від туберкульозу впродовж 65-75 діб. Це ж може свідчити про середню ступінь вірулентності мікобактерій відібраних для дослідю.

За бактеріологічного дослідження суспензії, приготовленої з біологічного матеріалу загинувших морських свинок на сьому добу культивування виявили три дрібні колонії кольору слонової кістки кількість яких та їх розмір в часі збільшувався.

#### **Дослідження біологічної активності (вірулентності) *M. bovis*.**

Ці дослідження проводили на морських свинках масою тіла 250-300 г нереагуючих на ППД-туберкулін для ссавців (відповідно існуючих вимог).

В результаті досліджень встановлено (табл. 1), що швидкорослі патогенні мікобактерії проявляють біологічну активність, яка характеризується певною закономірністю тривалості інфекційного процесу. З таблиці 1 видно, що в перші чотири прямих пасажів через організм морських свинок тривалість виживання послідовно знижувалася. На четвертому пасажі

тривалість інфекційного процесу виявилася найкоротшою і склала 29-33 доби. В наступному, розпочинаючи з п'ятого, тривалість інфекційного процесу подовжувалася і вже на 8-10 морські свинки залишалися живими.

Таблиця 1

**Біологічна активність (вірулентність) *M. bovis* пасажованих  
через щільне живильне середовище, на біологічній моделі  
(морських свинок)**

<i>M. bovis</i> , пасаж	Дослід	Строк виживання (доба) за пасажу									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1-10	I	35- 40	35- 43	32- 39	29- 33	33- 38	41- 50	67- 83	евтаназія		
100- 105	II	75- 76	63- 68	евтаназія				не досліджували			

У всіх досліджених свинок до сьомого пасажу на 17-21-ту добу формувалися виразки в ділянці введення завису (суспензії) мікобактерій. Виразки мали тенденцію до ускладнення впродовж дослідів.

В той же час алергічними дослідженнями дослідних морських свинок усіх пасажів на 30-ту добу дослідів виявляли алергічну реакцію на ППД-туберкулін для ссавців, в тому числі і в тварин 8-10-го пасажів, в яких інтенсивність реакції проявлялася менш демонстративно в порівнянні з реакціями, які виявлялися у морських свинок перших пасажів.

В той же час морські свинки через організм яких пасажувалися *M. bovis* 100-ої субкультури гинули від туберкульозу тільки в перші два пасажі, строк загибелі за цього практично рівнявся такому сьомому пасажу 20-ої генерації першого дослідів. В третьому-шостому пасажі морські свинки не гинули

впродовж 90 діб досліду. На цьому тлі виразка утворювалася у морських свинок тільки до четвертого прямого пасажу, а алергічні реакції відмічалися у дослідних тварин до закінчення досліду, тобто включно до шостого пасажу.

Ступінь патолого-анатомічного прояву туберкульозу наведено в таблиці 2. З таблиці слідує, що найвищий індекс ураження (від 22 до 24) за прямого пасажування 10-ої субкультури спостерігався впродовж чотирьох прямих пасажів. В послідууючому цей показник поступово знижувався і вже на восьмому він склав 5,4, що в 4,29 рази нижче, ніж в перші чотири. Водночас звертає увагу той факт, що хоча дослідні морські свинки 8-10 пасажу лишалися живими до 90-ої доби спостереження патолого-анатомічні зміни все ж таки виявлялися.

Практично в такій же послідовності індекс ураження спостерігався і за пасажів субкультури 100-го пересіву. Проте максимальний індекс ураження виявлено при першому прямому пасажі. Розпочинаючи з другого, наступного пасажу частота патолого-анатомічних змін, уражень тенденційно знижувалася і вони виявлялися практично тільки в лімфатичних вузлах, легенях та селезінці.

Результати контролю із замороженим біологічним матеріалом та пасажованими субкультурами на 10-му та шостому прямому пасажі виявилися подібними першому та другому досліду. Так при зараженні морських свинок суспензією приготовленої із біологічного матеріалу дослідних тварин з туберкульозними змінами виявлена алергія на туберкулін, виразка у ділянці введення суспензії та патолого-анатомічні зміни з індексом ураження 24. Зараження морських свинок пасажованими десять разів *M. bovis* через щільне живильне середовище Левенштейна-Йєнсена супроводжувалося такою ж біологічною відповіддю що й у першому пасажі з індексом ураження 24 внутрішніх органів дослідних тварин.

В другому досліді, з використанням як замороженого біологічного матеріалу так і пасажованих 100 разів *M. bovis* через щільне живильне середовище Левенштейна-Йєнсена встановлені подібні результати, проте

індекс ураження внутрішніх органів тварин так само як і у дослідних виявився дещо нижчим в 0,85 та 0,8 раза (табл. 2).

Таблиця 2

**Патолого-анатомічний прояв туберкульозу у морських свинок  
за прямих пасажів вірулентних *M. bovis***

M. bovis	Пасаж	Специфічні ураження				Індекс ураження
		лімфатичні вузли	селезінка	печінка	легені	
1	2	3	4	5	6	7
Субкультура	1	3,0± 0,0	6,0± 0,0	3,0± 2,12	12,0± 0,0	24,0± 2,12
	2	3,0± 0,0	6,0± 0,0	1,8± 2,68	11,2± 1,79	22,8± 2,68
	3	3,0± 0,0	5,2± 1,09	1,8± 2,68	12,0± 0,0	22± 3,0
	4	3,0± 0,0	6,0± 0,0	2,4± 2,5	12,0± 0,0	24± 2,12
	5	3,0± 0,0	5,6± 0,89	2,4± 2,5	10,4± 2,19	21,4± 3,2
	6	3,0± 0,0	5,2± 1,09	1,2± 1,6	8,8± 3,35	18,6± 4,5
	7	2,6± 0,54	3,6± 0,89	0,6± 1,34	7,2± 1,79	14± 2,7
	8	1,2± 0,45	2,0± 0,0	0,6± 1,34	1,6± 2,19	5,4± 3,05
	9	0,8± 0,45	0,8± 1,1	0,0	0,0	1,6± 1,34
	10	0,4± 0,55	0,8± 1,1	0,6± 1,34	0,0	1,8± 2,68
Контроль (біоматеріал): 1 субкультура	10	3,0± 0,0	6,0± 0,0	2,4± 2,5	12,0± 0,0	24,0± 3,67
Контроль: 10 субкультура	10	3,0± 0,0	6,0± 0,0	3,0± 2,12	12,0± 0,0	24± 2,12



Продовження табл.2.

1	2	3	4	5	6	7
100	1	2,6± 0,55	4,8± 1,09	3,0± 3,0	9,6± 2,19	20,0± 2,55
	2	2,6± 0,55	3,6± 0,89	2,4± 2,51	8,0± 0,0	16,2± 3,49
	3	1,6± 0,55	2,4± 0,89	1,2± 1,64	3,2± 1,79	8,4± 1,52
	4	0,8± 0,45	2,0± 0,0	1,2± 1,64	3,2± 3,35	7,2± 4,09
	5	0,8± 0,45	0,8± 1,09	1,2± 1,64	0,0	2,8± 1,64
	6	0,4± 0,55	1,2± 1,09	0,0	0,0	1,6± 1,52
Контроль (біоматеріал): 100 субкультура	6	2,6± 0,55	4,8± 1,09	2,4± 2,51	9,6± 2,19	20,4± 5,68
Контроль: 105 субкультура	6	2,6± 0,55	5,2± 1,09	1,8± 2,68	8,8± 3,35	19,2± 4,76

Паралельно зниженню індексу ураження внутрішніх органів морських свинок спостерігалось й динамічне згасання в порівнянні з алергічними реакціями, які проявлялися у морських свинок першого пасажу інтенсивності їх прояву (рис. 7).



**Рис. 7. Алергічна реакція на ППД-туберкулін у морської свинки 10 пасажу, зараженої суспензією біоматеріалу 9 прямого пасажу**

В той же час у морських свинок першого пасажу, заражених мікобактеріями вихідної 10-ої субкультури і заражених суспензією біологічного матеріалу (який знаходився в замороженому стані 20-ть місяців) інтенсивність алергічної реакції, патолого-анатомічний прояв і утворення виразки в ділянці інокуляції суспензії характеризувалися однаковими показниками.

Подібне виявлено і в контролі з використанням в десятому пасажі завису мікобактерій приготовлених з субкультур одержаних на середовищі Левенштейна-Йєнсена: за цього інтенсивність алергічної реакції, індекс ураження, утворення виразки у морських свинок були ідентичні.

Дані другого експерименту з використанням замороженого та розмороженого біологічного матеріалу через 20-ть місяців, а також пасажованих через штучне живильне середовище субкультур 100-ої генерації мікобактерій та ними заражених морських свинок на шостому пасажі засвідчили подібні першому дослідженню результати. Це переконливо свідчить про загальні біологічні властивості мікобактерій – знижувати ступінь вірулентності за прямих пасажів через організм морських свинок.

#### **2.4. Розрахунок економічної ефективності**

Під час виконання дипломної роботи були проведенні розрахунки економічних витрат на проведення досліджень.

В даному випадку за основу були взяті витрати на приготування одного штативу живильного середовища для культивування мікобактерій.

Для цього необхідно розрахувати:

- вартість одиниці часу;
- нарахувань на заробітну плату;
- вартість матеріалів і обладнання;
- затрати електроенергії.

Нарахування на заробітну плату у розмірах: 32 % – до пенсійного

фонду; 4 % – до фонду соціального страхування; 1,5 % – до фонду зайнятості; разом 37,5 %.

Нарахування за місяць –  $4800 \times 0,375 = 1,800$  грн

1. Вартість одиниці часу В2:

– посадовий оклад становить 4800 грн

– людино-день –  $4800 : 21 = 228,57$  грн

– людино-година –  $228,57 : 8 = 28,57$  грн

– людино-хвилина –  $28,57 : 60 = 0,47$  грн

Затрати часу становлять 180 хв., а його вартість (  $180 \times 0,47$  ) – 84,6 грн.

– Амортизаційні відрахування від вартості використаного обладнання

(В3): від використання сушильної шафи

Вартість – 5000 грн., термін використання – 7 років.

За місяць (  $5000:7$  ) – 68,0 грн.; за день (  $68,0:21$  ) – 3,23 грн; за годину (  $2,84:7$  ) – 0,46 грн; за хвилину (  $0,46:60$  ) – 0,007 грн

Використовується 70 хвилин :  $0,007 \times 70 = 0,49$  грн

– Від використання автоклаву

Вартість – 10 000 грн, термін використання 10 років.

За місяць (  $10\ 000:120$  ) – 83,3 грн; за день (  $83,3:21$  ) – 3,97 грн; за годину (  $3,97:8$  ) – 0,5 грн; за хвилину (  $0,5:60$  ) – 0,008 грн.

Використовується 40 хвилин:  $0,008 \times 40 = 0,33$  грн.

Отже, В2 –  $0,33 + 0,42 = 0,75$  грн.

2. Вартість інгредієнтів середовища (В4) для одного штативу (40 пробірок) становить 30 грн.

3. Затрати енергоносіїв (В5):  $0,41 \times 7 = 3,28$  грн

$V_{\text{в}} = V_1 + V_2 + V_3 + V_4 + V_5 = 5,4 + 14,4 + 30 + 0,75 + 3,28 = 53,83$  грн.

Отже, ветеринарні витрати на виготовлення одного штативу живильного середовища становить 53,83 гривні.

### **3. ОХОРОНА ПРАЦІ У ВЕТЕРИНАРНІЙ МЕДИЦИНІ**

#### **3.1. Аналіз стану охорони праці в умовах навчальної лабораторії кафедри епізоотології та інфекційних хвороб тварин**

Охорона праці являє собою систему законодавчих актів, соціально-економічних, організаційних, гігієнічних і лікувально-профілактичних засобів, які спрямовані на створення безпечних умов праці, збереження здоров'я і працездатності людей та їх здоров'я в процесі праці [21].

Законодавство України про охорону праці складається із: Закону “Про охорону праці”, “Кодексу законів про працю України”, Закону “Про забезпечення санітарного та епідеміологічного благополуччя населення”, Закону України “Про пожежну безпеку”, Норм радіаційної безпеки України, та інших нормативно правових актів, які регулюють взаємовідносини між різними суб'єктами права у сфері охорони праці [15].

Безпека проведення робіт у навчальній лабораторії забезпечується відповідно до вимог НПАОП 85.20-1.03-99 Правила охорони праці в лабораторіях ветеринарної медицини та інших нормативних актів.

Відповідальною за техніку безпеки та проведення організаційної роботи є завідувачка навчальної лабораторії Оржинська Марта Сергіївна.

У навчальній лабораторії студентам перед початком досліджень обов'язково проводять вступний інструктаж. При цьому особливу увагу звертають на небезпечні виробничі фактори, правильні прийоми роботи з застосуванням технічних засобів від яких залежить безпека праці на даному робочому місці.

Первинний інструктаж на робочому місці обов'язково реєструють в журналі реєстрації інструктажів з питань охорони праці на робочому місці.

Колективний договір забезпечує виконання профілактичних заходів щодо зниження рівня травматизму на робочому місці та можливих професійних захворювань.

За порушення законів і норм з охорони праці існують дисциплінарна, адміністративна, кримінальна та матеріальна відповідальність [9].

Відповідно до статті 19 Закону України “Про охорону праці” фінансування заходів з охорони праці здійснюється роботодавцем.

Для уникнення професійних хвороб і травм, що можуть загрожувати життю і здоров'ю працюючого персоналу та студентів слід дотримуватися усіх ветеринарно-санітарних та гігієнічних вимог.

Медичні огляди певних категорій працівників проводять у порядку, затвердженому наказом МОЗ України від 21.05.2007 № 246.

### **3.2. Аналіз небезпечних та шкідливих виробничих факторів**

Навчальна лабораторія за розмірами та характером розташування відповідає нормам технологічного проектування об'єктів ветеринарної медицини. Вона знаходиться з торцевої сторони корпусу факультету ветеринарної медицини, має окремий вхід. Територія огорожена парканом, озеленена та утримується у відповідному санітарному та протипожежному стані. Між житловою зоною та лабораторією дотримується санітарний розрив. В нічний час лабораторія освітлюється. Вхід сторонніх осіб у лабораторію забороняється.

Приміщення лабораторії мають центральне опалення та загальну примусову припливно-витяжну вентиляцію. Вентиляція забезпечує необхідну кратність обміну повітря та мікрокліматичні умови. Приміщення, в яких проводять особливо небезпечну роботу (бокси) оснащують додатковими витяжними шафами з бактеріологічним фільтром. Світильники у виробничих приміщеннях закриті і доступні для вологого прибирання. Природне і штучне освітлення відповідає вимогам СНиП 11-4-79.

У процесі виконання робіт у лабораторії можуть діяти небезпечні та шкідливі фактори (ГОСТ 12.0.003-74).

При роботі в лабораторії дотримуються наступних правил:

- всі маніпуляції проводяться у спеціальному одязі на спеціально обладнаних місцях;
- працюють тільки в гумових рукавичках та спеціальним інструментом. Забороняється торкатися руками дослідний матеріал;
- роботи повинні проходити в умовах достатнього освітлення та вентиляції;
- після закінчення роботи проводять ретельне очищення інструментарію, робочих місць, приладів, апаратури з наступною їх дезінфекцією;
- на випадок травмування в кабінеті завідуючого лабораторії знаходиться аптечка першої лікарської допомоги, яка постійно перевіряється та доповнюється.

Щоденно, після закінчення робочого дня, інфікований матеріал поміщають у термостат, який замикають. Кожну кімнату, в якій знаходиться патологічний матеріал, замикають та опечатують.

Лабораторія оснащена віварієм. Зоогігієнічні норми у віварії передбачені проектуванням, а також періодично перевіряються працівниками лабораторії. Чищення та миття кліток проводиться щоденно, після попереднього знезараження. Проводиться щоденний клінічний огляд тварин. Кількість заражених тварин, метод зараження, матеріал, дозу та результат спостережень за тваринами заносять у журнал бактеріологічних досліджень (ф.12-вет.). Весь персонал, який доглядає за тваринами дотримується правил особистої гігієни та техніки безпеки.

В лабораторії наявне наступне обладнання: автоклави, термостати, холодильник, сушильна шафа, рН-метр, лампа УФ-випромінювання, бокс для роботи з культурами, а також мікробіологічне обладнання та посуд, хімічні реактиви, барвники.

Всі проведенні дослідження та їх результати реєструються у журналі обліку культур.

У навчальній лабораторії кафедри епізоотології та інфекційних хвороб Дніпровського державного аграрно-економічного університету проводять наукові дослідження співробітники кафедри, аспіранти та студенти-дипломники. Працюючи в лабораторії, співробітники мають справу з культурами мікроорганізмів та лабораторними тваринами. Робота з культурами мікроорганізмів в лабораторії ведеться згідно вимог «Інструкції про порядок зберігання, підтримання, відпуску, завезення в Україну і вивезення штамів мікроорганізмів, токсинів і отрут тваринного та рослинного походження, які використовуються для потреб ветеринарної медицини та науки» (наказ №70 від 04.12.2002 Державний департамент ветеринарної медицини і зареєстровано в Міністерстві юстиції України 24.12.2002 за №999/7287).

Для працівників лабораторія має побутові приміщення.

Перед тим, як увійти до відділу або до іншого виробничого приміщення лабораторії, працівник одягає спеціальний одяг (халат, медичну шапочку або білу хустинку).

Робота з патологічним та іншим досліджуваним матеріалом проводиться в гумових рукавичках за використання інструменту (пінцет, корнцанг, ножиці тощо).

Після зняття гумових рукавичок негайно миють руки теплою водою з милом. Руки також миють після зняття забрудненого захисного одягу, перед виходом із лабораторії, перед уживанням їжі та протягом дня через інтервали, визначені характером роботи.

Після закінчення роботи з патологічним чи іншим досліджуваним матеріалом (зараженим або підозрілим у зараженні) робоче місце, поверхні столів, прилади, апаратуру, інструмент, пробірки, скло, гумові рукавички та інші предмети обробляють відповідним дезінфекційним розчином. Залишки інфікованого матеріалу (культура) термічно знезаражують (автоклавують).

Працівникам лабораторії забороняється:

– виходити за межі лабораторії в спецодязі та спецвзутті;

- одягати верхній одяг на халат;
- вносити у виробоче приміщення лабораторії сторонні речі;
- палити, пити воду, вживати їжу, жувати гумку, користуватися косметикою у виробничих приміщеннях;
- зберігати у виробничих приміщеннях продукти харчування.

Для утримання лабораторних тварин, лабораторія має віварій, де заражені та здорові тварини утримуються роздільно. Під час роботи з лабораторними тваринами (мурчаками, кролями) співробітники дотримуються правил техніки безпеки.

### **3.3. Пожежна безпека**

Правила пожежної безпеки для закладів, підприємств та організацій розроблені відповідно до Закону України від 17 грудня 1993 р. N 3745-12 «Про пожежну безпеку» та постанови Кабінету Міністрів України від 26 липня 1994 р. N 508 (508-94-п) «Про заходи щодо виконання Закону України «Про пожежну безпеку». Дані правила поширюється на приміщення навчальної лабораторії, та встановлюють вимоги пожежної безпеки, порядок дій у разі виникнення пожежі та є обов'язковою для вивчення і виконання відповідальним за пожежну безпеку, всіма особами, які перебувають у приміщеннях.

Викладачі, лаборанти та студенти повинні вивчити пожежонебезпечні властивості хімічних речовин і матеріалів, якими вони будуть користуватися, і дотримуватись правил пожежної безпеки при роботі з ними.

Для попередження виникнення пожежі не допускається нагрівати легкозаймисті речовини на відкритому вогні, електроплитах тощо (нагрівати слід на піщаній (або водяній) бані); залишати без нагляду ввімкнені електроприлади, та плити, електричне освітлення порушувати електропроводку, заставляти шафами й завішувати плакатами, картинами, газетами тощо електропроводи, електровимикачі, розетки.



Робочі поверхні та витяжні шафи, призначені для роботи з відкритим вогнем і пожежовибухонебезпечними речовинами, мають бути суцільно покриті негорючим матеріалом, а при роботі з кислотами та лугами – антикорозійним матеріалом, та мати спеціальні бортики. Легкозаймисті і горючі рідини (ЛЗР і ГР) потрібно зберігаються в лабораторії чітко за асортиментом у металевих ящиках і шафах. Не допускається спільне зберігання речовин, хімічна взаємодія яких може призвести до пожежі або вибуху.

У разі виявлення пошкоджень ізоляції електропроводки, штепселів, розеток та іншої пускорегулюючої апаратури необхідно відразу сповістити особу, відповідальну за енергогосподарство. Всі несправності повинні усуватися фахівцем.

За потреби вогнегасник знаходиться на першому поверсі у належному стані, викладачі, лаборанти та студенти вміють користуватися первинними засобами пожежогасіння.

При виникненні пожежі необхідно викликати пожежну охорону, зачинити вікна та квартирки, вимкнути вентиляцію та електроприлади, винести з приміщення горючі рідини, лужні метали й фосфор.

В коридорі на стіні розташована схема евакуації працівників на випадок пожежі.

Аналізуючи отриманні дані можна зробити такі висновки, що в лабораторії виконання робіт проходить згідно технологічної схеми, санітарно-побутові умови відповідають вимогам нормативних актів про охорону праці.

## ВИСНОВКИ І ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

1. *M. bovis* за прямих пасажів через організм морських свинок втрачають вихідну ступінь вірулентності: через 2-5 пасажів тварини не гинуть впродовж трьохмісячного дослідження;
2. Індекс ураження морських свинок за пасажів тенденційно знижується, особливо у тварин останніх пасажів;
3. Пасажовані (десять та шість разів) *M. bovis* через штучне живильне середовище викликають генералізований туберкульоз подібний до вихідних мікобактерій (у першому пасажі);
4. Заморожений біологічний матеріал з патолого-анатомічними змінами вихідних морських свинок та розморожений через 20 місяців викликає туберкульоз морських свинок, який за ступенем ураження подібний до вихідних.

### Пропозиції

Виявлені закономірності зниження ступеня вірулентності мікобактерій необхідно враховувати при оздоровленні господарств від туберкульозу і зокрема забезпечувати як найшвидше оздоровлення господарств, так як це може супроводжуватися появою у стаді тварин мікобактерій трансформованих форм. Їх персистенція в організмі тварин може призводити до ускладнення діагностики хвороби та зниженню ефективності протиепізоотичних заходів в конкретному сільськогосподарському підприємстві.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Аспекти морфогенезу та біологічні властивості *M. bovis* дисоціативних форм за різних температур культивування / О.А. Ткаченко, І.М. Шендрик, В. В. Місків [та ін.] // Вісник Дніпропетр. держ. аграр. ун-ту. – 2013. – № 1(31). – С. 77-83.
2. Бактериологическая диагностика туберкулеза животных / Н. П. Овдиенко, А. Х. Найманов, Ю. И. Смоляков [и др.] // Ветеринария. – 2006. – № 12. – С. 3-5.
3. Біологічна активність епізоотичних та музейних штамів *M. bovis* / О. А. Ткаченко, Н. Г. Усєєва, В. В. Глебенюк [та ін.] // Наук. вісник Львів. нац. ун-ту ім. С. З. Ґжицького. – 2007. – № 3(34), ч. 1, Т. 9. – С. 218-224.
4. Біологічні властивості дисоціативаних L- та інших форм *Mycobacterium bovis* / О. Ткаченко, П. Давиденко, В. Зажарський [та ін.] // Вісник Дніпропетр. університету. Біологія, екологія. – 2016. – № 24(2). – С. 338-346. [www.ecology.dp.ua](http://www.ecology.dp.ua)
5. Біологічні властивості дисоціативних форм *M. bovis*: культуральні особливості за температур 3 і 37 С / О. А. Ткаченко, М. В. Білан, В. В. Місків [та ін.] // Вет. медицина України. – 2010. – № 3. – С. 33-35.
6. Біологічні властивості дисоціативних форм *M. bovis*: морфологічні ознаки та тинкторіальні властивості за температур 3 та 37 С / О. А. Ткаченко, М. В. Білан, В. В. Зажарський [та ін.] // Вет. медицина України. – 2010. – №12. – С. 27-30.
7. Біохімічний склад швидкорослого штаму *M. bovis* в залежності від тривалості пасажування / О. Ткаченко, В. Бусол, М. Зеленська [та ін.] // Вет. медицина України. – 2006. – № 2. – С. 20-22.
8. Вейсфейлер Ю.К. Биология и изменчивость микобактерий туберкулеза и атипичные микобактерии. Будапешт: Академия наук Венгрии. – 1975. – 335 с.
9. Войналович О.В. Охорона праці у ветеринарній медицині. /

О.В. Войналович, Т.О. Білько, Є.І Марчишина. Навчальний підручник. – К.: Центр учбової літератури, 2016. — 554 с.

10. Вплив пасажування на біохімічний склад епізоотичного швидкорослого штаму *M. bovis* / О. А. Ткаченко, М. В. Зеленська, Г.І. Хільченко [та ін.] // Вісник Дніпропетр. держ. аграр. ун-ту. – 2005. – № 2.– С. 158-160.

11. Джупина С.И. Фундаментальные знания эпизоотического процесса – основа контроля туберкулеза крупного рогатого скота // Ветеринарная патология. Современные проблемы диагностики и профилактики туберкулеза животных. – 2004. – №1-2(9). – С. 45-47.

12. Донченко А.С., Донченко Н.А. Ветеринарні проблеми ліквідації туберкульозу великої рогатої худоби / Ветеринарна медицина України. – 2006. - №3. С. 18-19.

13. Дяченко Г., Кравченко Н., Романенко В. Проблема діагностики туберкульозу сільськогосподарських тварин в сучасних умовах // Ветеринарна медицина України. – 2006. - №2. – С. 5-7.

14. Завгородній А.І. Система епізоотологічного моніторингу, діагностики, профілактики та оздоровлення тваринництва України від туберкульозу / А. І. Завгородній, Б. Т. Стегній [та ін.] // Ветеринарна медицина України. – 2014.– №1.– С.10-13.

15. Закон України про «Охорону праці». К.: Основа, 2017. – 52 с.

16. Інструкція про заходи з профілактики та оздоровлення тваринництва від туберкульозу. Затверджена головним державним інспектором ветеринарної медицини України, протокол № 2 від 19.01.1994 року.

17. Лабораторна діагностика туберкульозу тварин: [практичний посібник] / О. А. Ткаченко, М. В. Білан, В. В. Зажарський, Л. О. Ковальова. – Дніпропетровськ: видавництво «Свідлер А. Л.», 2010. – 208 с.

18. Милько Е. С. Процесс диссоциации у бактерий: [учебное пособие] / Милько Е. С., Котова И. Б., Нетрусов А. И. – М.: Макс Пресс. –2007. – 68 с.

19. Микобактериоз, вызванный *Mycobacterium xenopi*, у крупного рогатого скота / А.Л. Лазовская, К.Н. Слина, З.Г. Воробьева и др. // Проблемы туберкулеза и болезни легких. – 2006. – №3. – С. 50-52.

20. Международный ветеринарный кодекс МЭБ. Одиннадцатое издание, 2002. – 511 с.

21. Основи охорони праці: [підручник]. 4-е вид. / за ред. М.П. Гандзюка. –К.: Каравела, 2008. – 384 с.

22. Особливості внутрішньовенної туберкулінової проби при туберкульозі та мікобактеріозній інфекції великої рогатої худоби / О. А. Ткаченко, Г. І. Хільченко, М. В. Зеленська [та ін.] // Ветеринарна медицина України. – 2003. – № 12. – С. 15-17.

23. Ощепков В.Г. До питання оптимізації протитуберкульозних заходів / Ветеринарна медицина України. – 2006. - №3. – С. 19-20.

24. Першикова Н.Л. Полиморфизм ДНК микобактерий, вызывающих неспецифические туберкулиновые реакции у сельскохозяйственных животных: автореф. дис. на соискание учён. степени канд. вет. наук: спец. 16.00.03 – «Ветеринарная микробиология, вирусология, эпидемиология, микология с микотоксикологией и иммунология» / Н.Л. Першикова. – Новосибирск, 2008. – 21 с.

25. Поліморфізм і мінливість *M. bovis* швидко- та повільнорослих штамів / О. А. Ткаченко, М. В. Білан, В. В.Зажарський [та ін.] // Ветеринарна медицина України. – 2009. – № 3. – С. 30-33.

26. Романенко В.Ф. Генетична обумовленість адаптивної мінливості мікобактерій туберкульозу / Вет. медицина України. – 2006. – №1. – С. 8-10.

27. Сапронова В.О. Методичні рекомендації до проведення практичних занять «Охорона праці у ветеринарній медицині». Дніпро, ДДАЕУ, 2018. – 41 с.

28. Сафина Ч. М. Выделение L-форм микобактерий туберкулеза от собак и кошек, реагировавших на ППД-туберкулин для млекопитающих / Ч. М. Сафина // Ученые записки казанской государственной академии

ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2010. – № 201. – С. 49-51.

29. Смирнов, А. М. Современные проблемы диагностики и профилактики туберкулеза животных / А. М. Смирнов // Ветеринарная патология. – 2004. – № 1–2. – С. 10-13.

30. Сучасні методи мікробіологічного обстеження донорів на туберкульоз (рекомендації) / В.В. Власенко, В.Л. Новак, В.С. Маланич та ін. – Київ. – 2001. – 38 с.

31. Ткаченко О.А. Біологічний цикл розвитку *Mycobacterium bovis* / О.А. Ткаченко // Ветеринарна медицина України. – 2014. – № 10. – С. 15-20.

32. Ткаченко О.А. Швидкоростучі *M. bovis* у проблемі туберкульозу / О.А. Ткаченко // Ветеринарна медицина України. – 2004. – № 7. – С. 14-17.

33. Ткаченко О.А. Мінливість *Mycobacterium bovis*: монографія / О.А. Ткаченко. – Житомир: Полісся, 2017. – Т. I. – 396 с.

34. Ткаченко О.А. Внутрішньошкірна туберкулінова проба, актуальні питання та деякі напрямки їх вирішення / О. А. Ткаченко // Ветеринарна медицина України. – 2002. – № 1. – С. 11-12.

35. Ткаченко О.А. Елементарні тільця у біологічному циклі *M. bovis* / О.А. Ткаченко, М.В. Білан, В.В. Зажарський, Л.О. Ковальова // Науково-технічний бюлетень інституту біології тварин і державного науково-дослідного контрольного інституту ветпрепаратів та кормових добавок. – Львів, 2009. – В.10. – № 4. – С. 212-216.

36. Ткаченко О.А. Морфологічні аспекти реверсії некислотостійких ниткоподібних *M. bovis* в бактеріальну кислотостійку форму / О.А. Ткаченко, О.Є. Галатюк, М.В. Білан [та ін.] // Сучасні проблеми туберкульозу в Україні: причини та шляхи їх подолання: наук.-практ. конф., 27–28 листопада 2008 р.: зб. наук. праць. – К., 2008. – С. 149-153.

37. Ткаченко О.А. Лабораторна діагностика туберкульозу тварин: практичний посібник / О.А. Ткаченко, М.В. Білан, В.В. Зажарський, Л.О. Ковальова. – Дніпропетровськ: Вид-во «Свідлер А.Л.», 2010. – 208 с.

38. Ткаченко О.А. Туберкульоз і мікобактеріозна інфекція великої

рогатої худоби // Автореф. дис. ... д-ра.вет. наук: 16.00.08 / НАУ. – К., 1999. – 35 с.

39. Туберкулез животных и меры борьбы с ним / Ю.Я. Кассич, А.Т. Борзяк, А.Ф. Кочмарский, О.В. Мартма и др.: Под ред. Ю.Я. Кассича. – К.: Урожай, 1990. – 304 с.

40. Хазипов Н. З. Туберкулез крупного рогатого скота / Н. З. Хазипов, М.А. Сафин, Г.З. Идрисов– Казань: Изд. Татарск. гуманит. института, 2000. – 168 с.

41. Хільченко Г.І., Ткаченко О.І., Короленко Л.С. Контамінація тваринницьких об'єктів степової зони України збудником туберкульозу великої рогатої худоби. / ВМУ. – 2006. – №3. – 33-35.

42. Цинзерлинг В.А., Современные подходы к морфологической диагностике туберкулёза / В.А. Цинзерлинг, М.М. Агапов // Туберкулёз и болезни лёгких – Санкт-Петербург, 2017. № 2. – С. 7-12.

43. Шлеева М. О., Салина Е. Г., Капрельянц А. С. Покоящиеся формы микобактерий: обзор // Микробиология. – 2010. – Т. 79, № 1. – С. 3-15.

44. Юсковец М.К. Туберкулез сельскохозяйственных животных и птиц. – Минск, 1963. – 449 с.

45. Beran V., Havelkova M., Kaustova J. et al. Cell wall deficient forms of mycobacteria: a review // Veterinarni Medicina. – 2006. - № 7 (51). – P. 365-389.

46. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology // Baltimore. – 1997. – V.2. – P / 606-612.

47. Cardona P., Ruiz-Manzano J. On the nature of Mycobacterium tuberculosis - latent bacilli // Europ. Respir. J. – 2004. – Vol. 24, № 6. – P. 1044-1051.

48. Monies R. G., Granwell M. P. et. all Bovine tuberculosis in domestic cats // Veterinary record. – 2000. – 146:14. – P. 407-408.

49. M. bovis infection / R. M. Smith, F. Drobniowski, A. Gibson [et al.] // Un. King. Emerg. Infect. Dis. – 2004. – Vol. 10. – P. 539–541.

50. Thoen C. The importance of M. bovis as a zoonosis / C. Thoen, P. Lobue, I. de Kantor // Vet. Microbiol. – 2006. – Vol. 112. – P. 339–345.

## ДОДАТКИ



## Original researches

Dependence of biochemical activities *Mycobacterium bovis* on passages and temperature of cultivationO. A. Tkachenko, N. I. Kozak, M.V. Bilan, A. R. Ponomarenko  
Dnipro State Agrarian and Economic University, Dnipro, UkraineReceived: 03 March 2019  
Revised: 29 March 2019  
Accepted: 10 April 2019Dnipro State Agrarian and Economic  
University, Sergii Efremov Str., 25, Dnipro,  
49600, UkraineTel.: +38-056-744-81-32  
E-mail: iamnatykozak@gmail.comCite this article: Tkachenko, O. A., Kozak,  
N. I., Bilan, M. V., & Ponomarenko, A.  
R. (2019). Dependence of biochemical  
activities *Mycobacterium bovis* on passages  
and temperature of cultivation. Theoretical and  
Applied Veterinary Medicine, 7(2), 84–89.  
doi: 10.32819/2019.71015

**Abstract.** The tuberculosis of cattle remains a serious problem both in Ukraine and for the whole world for many years. In spite of the fact that in science now much known about the agent of tuberculosis, some of the mechanisms through which mycobacteria manage to survive in the conditions of macroorganism and the environment have not been studied. Difficulties in overcoming of tuberculosis and mycobacteriosis can be connected with the incredible plasticity of life processes within the bacterial cells of mycobacteria. Understanding the enzymatic processes in the bacterial cell and their changes in response to the influence of external factors can lead to an understanding of the complex mechanism of adaptation and survival of mycobacteria, both in macroorganism and in the environment. The aim of our research was to determine the influence of the number passage of high-resistance strain *Mycobacterium bovis* in the organism of guinea pigs (*Cavia porcellus*), the temperature of cultivation (3°C; 37°C) on changes in biochemical activity. The ability of *M. bovis* and dissociative forms to grow on a nutrient medium with addition of sodium salicylate and on usual nutrient media (meat-peptone extract and meat-peptone agar) was investigated. The research was carried out using the high-virulence strain *M. bovis*, which was stored in the museum of the Laboratory of the Department of epizootology and infectious diseases of Dnipro State Agrarian and Economic University during 10–13 years, as well as dissociative forms 117-a, b, v, 118. The results of the research indicate the ability of mycobacteria to change biochemical activity under the influence of external factors. It has been established that the number of passages through a dense egg nutrient medium does not have a direct effect on the enzymatic activity of *M. bovis*. In dissociative forms with increasing number of inoculation of subcultures, the activity of nitrate reductase increases and peroxidase activity, dehydrogenase activity and catalase activity decrease. It has been found that low positive culturing temperature (3 °C) contributes to increase of catalase activity and hydrolysis ability of Tween-80. It has been determined that after passage through the organism of guinea pigs, *M. bovis* increase the activity of dehydrogenase and catalase and reduce nitrate reductase activity and hydrolysis ability of TWIN-80. So, the results presented in the article shows that the existence of mycobacteria is able to change the function of their own systems according to the changes of environment conditions..

**Keywords:** biochemical properties; catalase; peroxidase; dehydrogenase; hydrolysis of Tween-80; reduction of nitrates.

Залежність біохімічної активності *Mycobacterium bovis* від пасажів і температури культивуванняO. A. Ткаченко, Н. І. Козак, М. В. Білан, А. Р. Пономаренко  
Дніпровський державний аграрно-економічний університет, Дніпро, Україна

**Анотація.** Проблема туберкульозу великої рогатої худоби, на сьогодні, залишається актуальною як в Україні, так і в усьому світі. Незважаючи на те, що існує багато відомостей про збудника туберкульозу, деякі механізми його виживання в умовах макроорганізму та зовнішнього середовища не вивчені. Складнощі подолання туберкульозу та мікобактеріозів пов'язані з неймовірною пластичністю життєвих процесів всередині клітин мікобактерій. Розуміння ферментативних процесів у клітині та їх змін у відповідь на вплив зовнішніх факторів може підштовхнути до розуміння складного механізму адаптації та виживання мікобактерій як в умовах макроорганізму, так і в навколишньому середовищі. Метою досліджень було встановити вплив кількості пасажів високовірulentного штаму *Mycobacterium bovis* через організм морських свинок (*Cavia porcellus*), температури культивування (3 °C; 37 °C) на зміни біохімічної активності. Досліджено здатність *M. bovis* та дисоціативних форм рости на живильному середовищі з додаванням натрію саліциловокислого та на звичайних живильних середовищах (м'ясо-пептонному бульйоні та м'ясо-пептонному агарі). Дослідження проводили з використанням високовірulentного штаму *M. bovis*, який зберігали в музеї лабораторії кафедри епізоотології та інфекційних хвороб Дніпровського державного аграрно-економічного університету протягом 10–13 років, а також дисоціативних форм 117-а, б, в, 118. Результати досліджень свідчать про здатність мікобактерій змінювати біохімічну активність під впливом зовнішніх факторів. Встановлено, що кількість пасажів через щільне ячне живильне середовище не має прямого впливу на ферментативну активність *M. bovis*. У дисоціативних форм зі збільшенням кількості пересівів субкультур підвищується активність нітратредуктази та знижується активність пероксидази, дегідрогенази та каталази. З'ясовано, що низька шпорова температура культивування (3 °C) сприяє підвищенню каталазної активності та здатності до гідролізу ТВІН-80. З'ясовано, що після пасажування через організм морських свинок, *M. bovis* підвищують активність дегідрогенази та каталази, знижують нітратредуктазну активність і здатність до гідролізу ТВІН-80. Отже згідно результатів наведених у статті, мікобактерії здатні змінювати функцію власних систем відповідно до змін умов середовища.

**Ключові слова:** біохімічні властивості; каталаза; пероксидаза; дегідрогеназа; гідроліз ТВІН-80; редукція нітратів.

## Вступ

Традиційно визначення біохімічних властивостей мікроорганізмів застосовують у мікробіологічній практиці для полегшення визначення належності бактерій до конкретного виду та їх типізації. Проте, літературні джерела стосовно біохімічної активності мікобактерій свідчать про різну оцінку ефективності методів та їх доцільності використання в лабораторній ідентифікації мікроорганізмів.

Відомо, що *M. bovis* володіють каталазою та пероксидазою активністю (Yavorska & Sybirna, 2009). Стверджується, що *M. bovis* штаму у *Vallee* володіють ферментом каталазою, помірної активності (+ +) (Djachenko et al., 2009), тоді як згідно даних Kassich (2013) *M. bovis* не володіє каталазою активністю та здатністю до редукції нітратів і гідролізу Твін-80. У роботах Tkachenko (2017), де оцінювали біохімічну активність *M. bovis* та її дисоціативних форм, сверджується, що патогенний штам володіє слабкою біохімічною активністю, а саме, відсутністю каталази, пероксидази, нітратредуктази та слабкою дегідрогеназою активністю, тоді як дисоціативні форми, навпаки, мають виражену каталазну, пероксидазну та дегідрогеназну активність.

Все це настановує на думку, що внаслідок варіацій фенотипових характеристик мікобактерій виникає мінливість і їх біохімічних характеристик (Niemann et al., 1999; Tkachenko et al., 2007). Такі твердження є доречні, оскільки, з попередніх досліджень відомо, що мікобактерії володіють високим ступенем мінливості, а зміна біологічних властивостей *M. bovis* (культуральних, тинкторіальних, морфології) може супроводжуватися й іншими змінами, зокрема метаболізму, з яким тісно пов'язані синтетазні системи (ферменти зокрема) (Tkachenko, 2017). Це підтверджено дослідженнями й інших авторів, у результаті яких встановлено, що біохімічні властивості мікобактерій можуть частково змінюватися у певних стадіях розвитку (Wayne & Sramek, 1992; Lysenko et al., 2011).

Проте знання про наявність ферментних систем у мікобактерій дозволяє краще зрозуміти такі особливості, як вірулентність і стійкість до антимікобактеріальних препаратів (Charman, 1971; Charman, 1977; Yavorska & Sybirna, 2009).

З огляду на вищевикладене, метою було з'ясування пластичності ферментативних систем мікобактерій під впливом багаторазового пасажування через щільне живильне середовище за різних температур культивування та пасажування через організм лабораторних тварин.

## Матеріал і методи досліджень

Дослідження проводили в навчальній лабораторії кафедри епізоотології та інфекційних хвороб Дніпровського державного аграрно-економічного університету. В роботі використано музейний швидкорослий штам *M. bovis*, який пасажували (Tkachenko et al., 2007) через щільне живильне яєчне середовище Мордовського (Нове) з рН 6,7 за 37 °С, а саме, пасажі 54, 115, 143, 171, 195 (вихідні культури зберігали на середовищі без пересівів у пробірках закритих гумовими пробками за температури 3°С протягом 10–13 років); а також його дисоціативні варіанти, одержані за 2–3 °С культивування – 117-а, б, в, 118 (240-ї генерації). Дисоціанти були отримані внаслідок відщеплення авірулентних клітин від вірулентного епізоотичного штаму *M. bovis*, що відбулось після 116-ти разового пересівання заводу вірулентної культури на щільне живильне середовище та зберігання культур 117 пасажу протягом 20 місяців за умови низьких плюсових температур (Tkachenko, 2017). Контролем слугував патогенний високовірулентний лабораторний штам *M. bovis* 100-го пасажу. У біохімічних тестах використовували 3–4 тижневі культури бактерій першої генерації. Культури 54, 115, 171, 143, 195 пасажів *M. bovis* досліджували на зміни

біохімічної активності до та після пасажування через організм морських свинок.

Біопробу проводили на морських свинках (*Cavia porcellus*) згідно методики (Manchenko et al., 1994; Tkachenko et al., 2010). Зависом кожної культури (пасажі 54, 115, 171, 143, 195) заражали двох тварин під шкіру з внутрішньої сторони стегна в 1,0 мг/см<sup>3</sup> фізіологічного розчину. Через кожні 30 днів після ін'єкції їх досліджували туберкуліновою проборою – внутрішньошкірно ППД-туберкуліном для ссавців у дозі 25 МО в об'ємі 0,1 см<sup>3</sup> стерильного ізотонічного розчину. Облік реакції проводили через 24 та 48 год, а щотижневий контроль змін маси дослідних тварин кожні 10 днів методом зважування. По закінченню терміну біопробу (90 днів) морських свинок евтаназували ефірним наркозом і проводили патолого-анатомічні та бактеріологічні дослідження за загальноприйнятими методиками (Tkachenko et al., 2010).

Визначення каталазою та пероксидазою активності проводили одночасно (модифікована методика Богена). З цією метою до культур додавали свіжовиготовлену суміш 2%-вого розчину перекису водню та 0,5%-вого розчину пірогалолу А, які змішували безпосередньо перед постановкою реакції. Облік проводили через 15 та 30 хв (каталаза) та через 1,5–2 год (пероксидаза). Активність каталази оцінювали візуально за бурхливістю перебігу реакції та виділення кількості бульбашок кисню в першу хвилину: (+++) – значне виділення бульбашок; (++) – помірне; (+) – поодинокі бульбашки; (–) – відсутнє виділення бульбашок. Пероксидазну активність визначали за утворенням коричневого пігменту в колоніях мікобактерій завдяки перетворенню пірогалолу під дією ферменту пероксидази в пурпурогалін у присутності перекису водню. Облік реакції проводили в хрестах: (+++) – темно-коричневий колір колоній; (++) – коричневий; (+) – блідо-коричневий колір; (–) – колір не змінюється.

Дегідрогеназну активність, яка ґрунтується на виявленні окисно-відновного ферменту дегідрогенази та продуктів метаболізму, визначали в пробірках Елндорфа (Bloch, 1950). Для цього 4,0 см<sup>3</sup> завису мікробних клітин із концентрацією 10,0 мг/см<sup>3</sup> у фосфатному буфері рН 7,4–7,6 перемішували з 1 см<sup>3</sup> 1%-вого розчину глюкози і 0,1 см<sup>3</sup> 0,02%-вого розчину метиленового синього. На отриманий уміст у пробірці нашарували стерильне вазелінове масло. Пробірки ставили в термостат за температури 38 °С з подальшим контролем часу знебарвлення барвника. Облік реакції здійснювали через 15–30 хв і 24 год. Контролем були пробірки із зависом збудника та метиленовим синім без глюкози.

Редукцію нітратів, проводили за методами М. Tsuramura (1961) в модифікації Т.Б. Ільїної й співавтор. (1982). Для цього на торсійних вагах відмірювали 10,0 мг вологої біологічної маси із культури мікобактерій і вносили в бактеріологічну пробірку, що вміщувала 1,0 см<sup>3</sup> 0,067 М-фосфатного буфера (рН 7,1) з 0,1%-вим розчином нітрату натрію. Після суспендування культури інкубували за температури 37 °С протягом 20–22 год. Утворення нітрату перевіряли додаванням у пробірку двох крапель 2%-го розчину пара-диметиламінобензальдегіду на 1%-му розчині соляної кислоти. За позитивної реакції виникає жовте забарвлення, за негативної – колір розчину не змінюється (рис. 1Б).

Реакцію гідролізу ТВІН-80 визначали за модифікованою методикою Вайна. Під час дослідження використовували 1/15 М фосфатний буфер (рН 7) – 100,0 см<sup>3</sup>, ТВІН-80 – 0,5 см<sup>3</sup>, основний нейтральний червоний, 0,1 % – 2,0 см<sup>3</sup>. Перед початком дослідження усі три реагенти змішували, розливали по 4,0 см<sup>3</sup> у пробірки й автоклали за 120 °С 15 хвилин. Протягом доби перевіряли на стерильність у термостаті. Для визначення здатності бактерій гідролізувати ТВІН-80 три бактеріологічні петлі кожної з досліджуваних культур емульгували в пробірках із виготовленим субстратом (ТВІН-80 із нейтральним червоним).

O. A. Tkachenko, N. I. Kozak, M.V. Bilan, A. R. Ponomarenko  
 Depending of biochemical activities *Mycobacterium bovis* on passages and temperature of cultivation

Пробірки витримували в термостаті, реакцію перевіряли через 4 год, на 5-у та 10-у добу. Тест вважався позитивним, якщо рожево-червоне забарвлення з'явилося до 10-ої доби, негативним, якщо забарвлення не з'явилося. Контролем була пробірка із середовищем без реактивів.

Культури мікроорганізмів досліджували на здатність рости на звичайних живильних середовищах (м'ясо-пептонний бульйон і м'ясо-пептонний агар) та яечному середовищі з додаванням натрію саліциловокислого. Для цього до середовища Мордовського перед його згортанням додавали натрій саліцилат з розрахунку 100 000,0 мкг на 1,0 см<sup>3</sup> середовища. Контролем слугували пробірки з посівами на класичне живильне середовище Мордовського.

Біохімічні тести усіх варіантів культур проводили в п'ятиразових повторностях.

### Результати

На першому етапі дослідження з'ясували коливання активності ферментів мікобактерій залежно від кількості пасажів і температури культивування (табл. 1). Необхідно зазначити, що не всі культури задіяні в досліді були здатні рости за низької температури культивування (3 °С), пасажі 54, 143, 195, а також контрольний високовірulentний штам *M. bovis* росли тільки за 37 °С. Деякі культури (пасаж 135 та дисоціанти – 117-а, б, в, 118), проявляли ростові властивості тільки за низьких плюсових температур (3 °С).

З огляду на дані, наведені в таблиці 1, можна стверджувати, що відмічена тенденція до зміни біохімічної активності досліджуваних мікроорганізмів. Встановлено підвищення каталазної активності залежно від зниження температури культивування (пасажі 115 та 171). Пероксидазна активність спостерігалася тільки у контрольного високовірulentного штаму з усіх досліджуваних культур. Дегідрогеназна активність у перші 15–30 хв не була виявлена в жодній культурі, але вже через 24 год відмічалася майже в усіх культур, окрім 54 пасажу та 117-а. Редукція нітратів виявилася позитивною в усіх культур окрім пасажу 143 та 171 за температури культивування 37 °С. Гідроліз ТВІН-80 у

перші 4 години був відсутній в усіх культурах. Культури пасажів 115 та 171, які були вирощені за низької плюсової температури культивування, володіли вищою здатністю до гідролізу ТВІН-80 на 5 добу.

Якщо співставити отримані в цьому досліді результати з раніше опублікованими даними по дослідженні ферментативної активності *M. bovis* дисоціативних форм 15 генерації (Tkachenko, 2017), то можна стверджувати про значні зміни біохімічної активності бактерій.

Провівши зараження лабораторних тварин дослідними культурами (пасажі 54–195) у жодній з дослідних тварин не встановили позитивної алергічної реакції на туберкулін та не відмічали зниження маси тіла. По закінченню біопробі (90 діб) в органах дослідних тварин не виявили патологоанатомічних змін. Виготовлену суспензію з органів морських свинок висіяли на щільне живильне середовище, а у отриманих культур дослідили біохімічну активність.

Якщо порівняти дані таблиці 1 (вихідні культури) та 3 (культури отримані з органів лабораторних тварин після одноразового пасажування через організм морських свинок), то можна прослідкувати певні закономірності в змінах біохімічної активності культур досліджуваних пасажів, а саме: підвищення активності ферменту дегідрогенази – пасажі 54, 135 і 171 (за 3 °С); втрату здатності редукувати нітрати, особливо в культур одержаних за низьких температур (за 3 °С) – пасажі 115, 135, 171, та за 37 °С пасаж 195; підвищення каталазної активності – пасажі 115 і 171 за обох температур культивування (3 та 37 °С); ферментативна здатність до гідролізу ТВІН-80 в переважній більшості культур знижувалась – пасажі 115 (3 та 37 °С), 171 (3°С), 135, 195, і тільки в одній культурі – пасаж 54 незначно підвищувалась. Також слід зазначити, що біохімічна активність однієї культури – пасажу 143 після пасажування через організм морських свинок залишилась незмінною.

На останньому етапі дослідження з'ясували здатність *M. bovis* розмножуватися й накопичуватися на простих живильних середовищах і за наявності натрію саліциловокислого (табл. 4). Усі досліджувані культури мали здатність рости на МПА та майже всі (за винятком пасажів 54 та 117А) на МПБ. На сере-

Таблиця 1. Ферментативна активність *Mycobacterium bovis*

№ пасажу	Температура культивування, °С	Каталаза	Пероксидаза	Дегідрогеназа		Редукція нітратів	Гідроліз ТВІН-80		
				15–30 хв	24 год		4 год	5 діб	10 діб
54	37	++ 80%	–	–	–	+	–	–	–
	37	–	–	–	±	+	–	±	+
115	37	100%	100%	80%	60%	80%	100%	80%	80%
	3	+	–	–	+	+	–	+	+
135	37	+++ 100%	–	–	±	+	–	±	±
	37	+++ 100%	–	–	+	–	–	–	–
143	37	+++ 100%	100%	100%	80%	100%	100%	100%	100%
	37	–	–	–	+	–	–	–	–
171	37	60%	100%	80%	100%	80%	100%	60%	60%
	3	+	–	–	±	+	–	±	+
195	37	100%	100%	100%	80%	80%	100%	60%	80%
	37	+	–	–	+	+	–	±	±
Контроль	35	–	+	–	+	+	–	–	+
	35	60%	60%	100%	60%	80%	100%	80%	80%

Примітка: + – позитивна реакція; – – негативна реакція; ± – сумнівна реакція.

**О. А. Tkachenko, N. I. Kozak, M.V. Bilan, A. R. Ponomarenko**  
**Depending of biochemical activities *Mycobacterium bovis* on passages and temperature of cultivation**

**Таблиця 2.** Ферментативна активність дисоціативних форм *Mycobacterium bovis* 15 та 240 генерації

№ пасажу	Генерація	Каталаза	Пероксидаза	Дегідрогеназа		Редукція нітратів	Гідроліз ТВІН-80		
				15–30 хв	24 год		4 год	5 діб	10 діб
117-а	240	++ 100%	– 100%	– 100%	– 80%	– 100%	– 100%	– 80%	– 80%
	15	+++	+++	+	–	–	Не досліджували		
117-б	240	– 60%	– 100%	– 100%	– 60%	– 80%	– 100%	– 80%	– 80%
	15	+++	+++	+	–	–	Не досліджували		
117-в	240	– 80%	– 100%	– 100%	– 60%	– 60%	– 100%	– 60%	– 80%
	15	+++	+++	+	–	–	Не досліджували		
118	240	– 80%	– 100%	– 80%	– 80%	– 80%	– 100%	– 80%	– 100%
	15	+++	+++	+	–	–	Не досліджували		

**Примітка:** ++ – позитивна реакція; – – негативна реакція; ± – сумнівна реакція.

довиці з натрієм саліциловокислим колонії утворювали більшість культур, окрім пасажів 54, 135, 171 (за 3 °С) та 118.

#### Обговорення

Вже описана багатьма авторами (Djachenko et al., 2009; Yavorska & Sybirna, 2009; Lysenko et al., 2011; Glebenjuk & Telizhenko, 2015; Tkachenko, 2017) висока мінливість мікобактерій, їх культуральних, тинкторіальних властивостей і морфології ще раз підтверджена нашим дослідом стосовно біохімічної активності цих мікроорганізмів. Отримані результати досліджень переконливо свідчать про неймовірну пластичність ферментативних систем *M. bovis*, що можна розглядати як механізм пристосування до змін середовища існування бактерій.

Підсумовуючи результати ми не побачили чіткої залежності між змінами біохімічної активності бактерій досліджуваних культур *M. bovis* і кількістю пасажів. Однак, ферментативна активність залежала від температури культивування (так у

культур вирощених за температури 3 °С була вища каталазна активність і здатність до гідролізу ТВІН-80).

Стосовно дисоціативних форм, за даними Tkachenko (2017), культури 117-а, б, в і 118 у 15 генерації володіли добре вираженою активністю ферментів каталази, пероксидази та дегідрогенази (знебарвлення розчину метиленової синьки за 15-30 хв) та не володіли нітратредукуючими властивостями. Тоді як у 240 генерації в них знизилася активність ферменту каталази, а в 117-в варіанті активність даного ферменту взагалі була відсутня. Пероксидазна активність не була виявлена в жодній з досліджуваних культур 240 генерації. Дегідрогеназна активність також була помітно слабшою, розчин метиленової синьки знебарвлювався через 24 год у варіанті 117-б повністю та неповністю – в 117-в і 118, у 117-а знебарвлення не відбувалось взагалі. Редукція нітратів у всіх культур дисоціативних форм 240 генерації виявилась позитивною. Проаналізувавши зміни активності ферментів дисоціативних форм *M. bovis* визначили, що порівняно з 15 генерацією, в 240 генерації, дисоціанти за-

**Таблиця 3.** Ферментативна активність *Mycobacterium bovis* після пасажування через організм лабораторних тварин

№ пасажу	Температура культивування, °С	Каталаза	Пероксидаза	Дегідрогеназа		Редукція нітратів	Гідроліз ТВІН-80		
				15–30 хв	24 год		4 год	5 діб	10 діб
54	37	++ 100%	– 100%	– 100%	± 100%	– 100%	– 100%	– 100%	± 60%
	37	++ 100%	– 100%	– 80%	± 60%	– 100%	– 100%	– 80%	– 80%
115	3	++ 100%	– 100%	– 100%	– 100%	– 100%	– 100%	± 60%	– 80%
	37	+++ 100%	– 100%	– 100%	± 100%	– 100%	– 100%	± 100%	– 100%
143	37	+++ 100%	– 100%	– 100%	– 100%	– 100%	– 100%	– 100%	– 100%
171	37	+++ 100%	– 100%	– 80%	– 100%	– 100%	– 100%	– 100%	– 100%
	3	++ 100%	– 100%	– 80%	– 100%	– 100%	– 100%	– 100%	± 80%
195	37	– 100%	– 100%	– 80%	– 60%	– 100%	– 100%	– 60%	± 60%

**Примітка:** + – позитивна реакція; – – негативна реакція; ± – сумнівна реакція.

O. A. Tkachenko, N. I. Kozak, M.V. Bilan, A. R. Ponomarenko  
 Depending of biochemical activities *Mycobacterium bovis* on passages and temperature of cultivation

Таблиця 4. Ріст *Mycobacterium bovis* і дисоціативних форм на звичайних живильних середовищах і середовищі з додаванням натрію саліциловокислого

№ пасажу	Температура культивування, °C	Середовище Мордовського	Середовище з додаванням натрію саліциловокислого	МПА	МПБ
54	37	–	–	+	–
115	37	+	+	+	+
135	3	+	+	+	+
143	37	+	+	+	+
171	37	+	+	+	+
195	37	–	–	+	+
Контроль	37	–	+	+	+
117a	3	+	+	+	–
1176	3	–	+	+	+
117в	3	+	+	+	+
118	3	+	–	+	+

Примітка: + – відмічено ріст культури; – – ріст культури відсутній.

галом значно знизили свою біохімічну активність (дегідрогеназу та каталазу; пероксидазна зникла повністю), але набули нової здатності, що раніше не відмічалася, редукувати нітрати.

Традиційно вважається, що *M. bovis* (на відміну від *M. tuberculosis*) не мають помітної активності нітратредуктази (Bonicke et al., 1970; Fritz, 2002), деякі дослідники у своїх роботах висловлюють думку, що *M. bovis* BCG (вакциний штам) використовує нітрати як ключове джерело живлення, підтримуючи бактеріальний метаболізм у легенях, печінці та нирках через відновлення нітрату до нітригу. Автори стверджують, що нітрат може забезпечити енергію для бактеріального метаболізму навіть у анаеробному середовищі (Philippot & Højberg, 1999; Fritz, 2002; Glebenyuk & Petrussha, 2018). Крім того, аналіз наявності ферменту нітратредуктази широко використовують у лабораторній практиці в якості альтернативного методу виявлення резистентності нітратредуктазно-позитивних штамів мікобактерій до протитуберкульозних препаратів, таких як ізоніазид, рифампіцин, етамбутол, офлоксацин, стрептоміцин та деякі інші. Штам вважався стійким, якщо він володіє нітратредуктазною активністю (Fonseca et al., 2002; Angeby et al., 2002; Montoro et al., 2005; Martin et al., 2005; Lemus, 2006).

Виходячи з цього вважаємо, що зміни, які відбулись з ферментативними системами дисоціативних форм *M. bovis* відображають процеси перелаштування обмінних реакцій всередині бактеріальної клітини, які відбулися за період багаточисельних пересівів через живильне середовище та направлені на забезпечення живлення мікроорганізмів за рахунок енергії отриманої шляхом редукції нітратів.

Цікавими були також зміни ферментативної активності після пасажування через організм морських свинок. У культурах, отриманих з органів, відмічали зниження нітратредуктазної активності (було характерно для культур вирощених за 3°C) та здатності до гідролізу ТВІН-80. Особливо цікаво те, що після пасажування через живий організм *M. bovis* у бактерій підвищилася активність ферментів дегідрогенази та каталази. Це багатифункціональні гемозалежні ферменти, які беруть активну участь у окисно-відновних процесах антиоксидантного захисту мікробної клітини.

У літературних джерелах повідомлено, що каталаза сприяє здатності *M. tuberculosis* виживати в контамінованих тканинах господаря, що було підтверджено лабораторними експериментами на мишах і морських свинках (Li et al., 1998). У роботі Manca et al., (1998) досліджували каталазу та пероксидазу активність лабораторних, клінічних і рекомбінантних штамів *M. tuberculosis*, їх вимірювали як внутрішньоклітинно (в моноцитах людини), так і в живильному середовищі. Результати свідчать про те, що в штамів у яких була присутня навіть мінімальна активність каталази виживало значно більше бактерій (85%) за впливу екзогенного H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Автори припускають, що стійкість мікобактерії до окисних метаболітів може бути важливим механізмом бацілярного виживання в фагоцитах господаря. Згідно деяких тверджень, активність каталази та пероксидази виступає як фактор вірулентності мікобактерій. Наприклад, додавання екзогенної каталази *in vitro* під час інфікування мишачих макрофагів атипичними мікобактеріями, такими як *M. avium* показало, що виживання мікобактерій посилюється (Manca et al., 1998).

Також деякі автори зазначають, що активність синтезу ендогенної каталази та здатність до розщеплення перекису водню також пов'язана за стійкістю до протитуберкульозних препаратів (тубазиду, фтівазиду, ізоніазиду та інших). Мікобактерії туберкульозу, стійкі до даних препаратів, мають різко знижену або відсутню активність цих ферментів (Manca et al., 1998).

Отже, ми вважаємо, що пасажування через організм тварин привело до активізації механізмів адаптації бактерій і підвищення активності окисно-відновних ферментів *M. bovis* для забезпечення виживання всередині макроорганізму як відповідь на зміни умов існування.

Проте, отримані результати свідчать, що остаточна типізація мікобактерій і визначення видової належності на основі біохімічних тестів є неможливою, оскільки ці характеристики можуть сильно варіювати в представників одного й того ж виду залежно від умов середовища існування конкретного мікроорганізму.

Така точка зору також підтримується й іншими вченими (Yavorska & Sybirna, 2009; Lysenko et al., 2011). Мікобактерії

**O. A. Tkachenko, N. I. Kozak, M. V. Bilan, A. R. Ponomarenko**  
**Depending of biochemical activities *Mycobacterium bovis* on passages and temperature of cultivation**

здатні швидко змінювати метаболічні процеси та пристосовуватись до умов оточуючого середовища. Порівняна сила біохімічних тестів поодиноці обмежена, оскільки різні види можуть проявляти подібні чи ідентичні результати в однакових реакціях. Для ідентифікації на рівні виду рекомендується додатково проводити й інші дослідження, наприклад, аналіз жирних кислот, виявлення швидкості росту бактерій, ПЛР дослідження (Wayne & Sramek, 1992; Tkachenko, 2017).

#### Висновки.

1. Ферментативна активність *M. bovis* (пасажі 54–195) не залежить від кількості пересівів субкультур. У дисоціативних форм зі збільшенням кількості пересівів субкультур знижується активність дегідрогенази, каталази, пероксидази та підвищується активність нітратредуктази, що може свідчити про набуття ними патогенності.

2. Мікобактерії одержані за низьких плюсових температур, проявляють вищу каталазну активність і здатність до гідролізу ТВІН-80, порівняно з культурами які виросли за 37 °C.

3. *M. bovis* культур, отриманих після пасажування через організм морських свинок знижують нітратредуктазну активність, здатність до гідролізу ТВІН-80 і підвищують активність дегідрогенази та каталази.

#### References

- Angeby, K. A. K., Klintz, L., & Hoffner, S. E. (2002). Rapid and inexpensive drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* with a nitrate reductase assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(2), 553–555.
- Bonicke, R., Juhasz, S. E., & Diemer, U. (1970). Studies on the nitrate reductase activity of mycobacteria in the presence of fatty acids and related compounds. *American Review of Respiratory Disease*, 102, 507–515.
- Chapman, J. S. (1971). The ecology of the atypical *Mycobacteria*. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 22(1), 41–46.
- Chapman, J. S. (1977). *Epidemiology. The atypical Mycobacteria and human Mycobacteriosis*, 33–43.
- Djachenko, G. M., Kravchenko, N. O., Illynh, V. V., Dmytruk, O. M., & Golovach, O. V. (2009). Adaptacija ta minlyvist vlastyvoestej mikobakterij riznyh vydiv za vplyvu antybakterialnyh preparativ [Adaptation and variability of the properties of mycobacteria of different species for the influence of antibacterial drugs]. *Silskogospodarska Mikrobiologija*, 9, 158–165 (in Ukrainian).
- Fonseca, L. de S., Vieira, G. B. de O., Sobral, L. F., Ribeiro, E. O., & Marsico, A. G. (2012). Comparative evaluation under routine conditions of the nitrate reduction assay, the proportion assay and the MGIT 960 assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(1), 142–144.
- Fritz, C. (2002). Dependence of *Mycobacterium bovis* BCG on anaerobic nitrate reductase for persistence is tissue specific. *Infection and Immunity*, 70(1), 286–291.
- Glebenjuk, V. V. & Telizhenko, K. V. (2015). Vydova nalezhnist' mikobakterij, vydilyenyh vid tvaryn u Dnipropetrovs'koi' oblasti [Species belonging to mycobacteria isolated from animals in the Dnipropetrovsk region]. *Science and technology bulletin of SRC for biosafety and environmental control of AIC*, 3 (1), 61–64 (in Ukrainian).
- Glebenjuk, V. V., & Petrusha, V. G. (2018). Stability attenuation of BCG vaccine strain. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies*, 20(83), 168–171.
- Yavorska, G. V., & Sybirna, R. I. (2009). Morfolohichno-kulturalni i fiziolohe-biokhimichni vlastyvoesti atypovykh mikobakterii [Morphological-cultural and physiological and biochemical properties of atypical mycobacteria]. *Mikrobiolohichniy Zhurnal*, 71(4), 27–34 (in Ukrainian).
- Kassich, V. Ju. (2013). Mikobakterii ta ih dyferenciacija [Mycobacteria and their differentiation]. *Visnyk Sumskogo Nacionalnogo Agrarnogo Universytetu*, 2, 109–115 (in Ukrainian).
- Lemus, D. (2006). Nitrate reductase assay for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: simple and inexpensive method for low-resource laboratories. *Journal of Medical Microbiology*, 55(7), 861–863.
- Li, Z., Kelley, C., Collins, F., Rouse, D., & Morris, S. (1998). Expression of katG in *Mycobacterium tuberculosis* is associated with its growth and persistence in mice and guinea pigs. *Journal of Infectious Diseases*, 177(4), 1030–1035.
- Lysenko, A. P., Vlasenko, I. G., Vlasenko, V. V., & Babijchuk, Ju. V. (2011). Biohimicheskie svojstva bacyljarnyh i izmenennyh form mikobakterij, vyrashhennyh na pitatel'nyh sredah [Biochemical properties of bacillary and modified forms of mycobacteria grown on nutrient media]. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies*, 13(50), 249–252 (in Russian).
- Manca, C., Paul, S., Barry, C. E., Freedman, V. H., & Kaplan, A. (1998). *Mycobacterium tuberculosis* catalase and peroxidase activities and resistance to oxidative killing in human monocytes in vitro. *Infection and Immunity*, 67(1), 74–79.
- Manchenko, V. M., Trocenko, Z. R., & Pavlenko, M. S. (1994). *Nastanova po diagnostycki tuberkulozu [Guidelines for diagnosing tuberculosis]*. Kyiv (in Ukrainian).
- Martin, A., Palomino, J. C., & Portaels, F. (2005). Rapid detection of ofloxacin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by two low-cost colorimetric methods: resazurin and nitrate reductase assays. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(4), 1612–1616.
- Montoro, E., Lemus, D., Echemendia, M., Martin, A., Portaels, F., & Palomino, J. C. (2005). Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test, and the resazurin microtitre assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55(4), 500–505.
- Niemann, S., Richter, E., & Rusch-Gerdes, S. (1999). Differentiation among members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular and biochemical features: Evidence for two pyrazinamide-susceptible subtypes of *M. bovis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(1), 152–157.
- Philippot, L., & Højberg, O. (1999). Dissimilatory nitrate reductases in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Gene Structure and Expression*, 1446(1–2), 1–23.
- Tkachenko, O. A. (2017). *Minlyvist Mycobacterium bovis: monografiya [Mycobacterium bovis variability: monograph]*. Zhytomyr, Polissja (in Ukrainian).
- Tkachenko, O. A., Usejeva, N. G., Glebenjuk, V. V. & Kulishenko, O. M. (2007). Biologichna aktyvnist epizootychnyh ta muzejnyh shtamiv *M. bovis* [Biological activity of the epizootic and museum strains *M. bovis*]. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies*, № 3(34), 218–224 (in Ukrainian).
- Wayne, L. G., & Sramek, H. A. (1992). Agents of newly recognized or infrequently encountered mycobacterial diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 5(1), 1–25.



Міністерство освіти і науки України  
 Дніпровський державний аграрно-економічний університет  
 Факультет ветеринарної медицини  
 Кафедра епізоотології та інфекційних хвороб тварин

## СЕРТИФІКАТ

Учасника

Пономаренко Анна Русланівна

Міжнародної науково-практичної конференції

«ІНФЕКЦІЙНА ПАТОЛОГІЯ ТВАРИН: СУЧАСНІ МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ,  
 ЛІКУВАННЯ ТА ПРОФІЛАКТИКИ»

21-22 вересня 2018 року

м. Дніпро



Голова оргкомітету, ректор

А.С. Кобець



ДЕРЖПРОДСПОЖИВСЛУЖБА УКРАЇНИ  
 ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ КОНТРОЛЬНИЙ ІНСТИТУТ  
 ВЕТЕРИНАРНИХ ПРЕПАРАТІВ ТА КОРМОВИХ ДОБАВОК

# СЕРТИФІКАТ

виданий

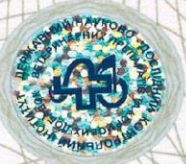
Анні Пономаренко  
 VIII Міжнародна

**науково-практична конференція «Ветеринарні препарати:  
 розробка, контроль якості та застосування»**

1-4 жовтня 2019, м. Львів

*Сертифікат є підтвердженням підвищення кваліфікації*

Директор ДНДКІ ветеринарних  
 та кормових добавок,  
 д. вет. н., професор, академік НААН,  
 засл. діяч науки і техніки України



І. Я. Коцномбас



## Додаток Г



**Приготування  
препарату мазка**





**Дослідження культур під  
мікроскопом «Micromed»**



**Обладнання навчальної  
лабораторії**